

Kemialliseen siirtymään vaikuttavat parametrit ja siirtymän ennustaminen NMR-spektroskopiassa

Pro gradu-tutkielma

Sini Aalto

Orgaanisen kemian yksikkö

Kemian laitos

Helsingin yliopisto

huhtikuu 2018



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

MATEMAATTIS-LUONNONTIEDELLINEN TIEDEKUNTA
MATEMATISK-NATURVETENSKAPLIGA FAKULTETEN
FACULTY OF SCIENCE

Tiedekunta – Fakultet – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma – Utbildningsprogram – Degree programme Kemia	
Tekijä – Författare – Author Sini Aalto			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Kemialliseen siirtymään vaikuttavat parametrit ja siirtymän ennustaminen NMR-spektroskopiassa			
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu tutkielma		Aika – Datum – Month and year Huhtikuu 2018	Sivumäärä – Sidoantal – Number of pages 198 + 16 (=214)
Tiivistelmä – Referat – Abstract <p>Tutkielman teoriaosuudessa esitellään lyhyesti ydinmagneettisen resonanssispektroskopian (NMR) perusteet sekä kuvaillaan eri tekijöitä, jotka vaikuttavat kemiallisen siirtymän suuruuteen. Lisäksi kyseisten tekijöiden vaikutusta siirtymiin kuvaillaan yleisellä tasolla. Esiteltävät parametrit ovat molekyyli rakenne, liuotin, vuorovaikutusten määrä, konsentraatio, pH ja ionivahvuus sekä lämpötila.</p> <p>Teoriaosiossa esitellään myös erilaiset menetelmät, joilla kemiallista siirtymää on mahdollista mallintaa ja tämän myötä ennustaa. Ennusteiden ongelmat ja kehitysmahdollisuudet esitellään lyhyesti ja erilaisia empiirisiä, kvanttimekaanisia ja semi-empiirisiä menetelmiä käydään läpi tarkemmin. Näistä kokonaisuuksina esitellään tietokantoihin, inkrementaalsiin keinoihin, neuroniverkkoihin, tiheysfunktionaaliteorialle (DFT) sekä <i>Ab initio</i> -laskuille perustuvia menetelmiä. Erilaisia mallinnustapoja vertaillaan lyhyesti keskenään.</p> <p>Pro Gradu tutkielman käytännön osuus suoritettiin Helsingin yliopiston kemian laitoksen Kemiallisen aseen kieltosopimuksen instituutti (VERIFIN) -yksikössä ja tutkielman osana olevassa käytännön osiossa käsitellään erilaisten aromaattisten arseeniyhdisteiden kemiallisten siirtymien tutkimusta jossa kemiallisen siirtymän muutosta erilaisissa pH-ympäristöissä tutkittiin valmistamalla puhtasaineista pH-sarjat metanolissa. Tutkitut yhdisteet olivat fenyylidiklooriarseeni (PDCA), trifenyyliarseenioksidi (TPAO), trifenyyliarseeni (TPA), Adamsiitin arsiinihappo (DM-happo), difenyyliarsemiinihappo (DPAA) ja monofenyyliarsemiinihappo (MPAA). Kokeelliset siirtymät on sovitettu teoriaosuudessa esiteltyyn Henderson-Hasselbalch -yhtälön mukaiseen käyrään, jonka perusteella muutoksen ollaan voitu todeta olevan lähes kaikissa tutkituissa tapauksissa huomattavaa, mutta yhtälön mukaan ennustettavaa.</p> <p>Kaikkea edellämainittua kokeellista dataa sovellettiin Itämerestä peräisin olleiden kahden erillisen sedimenttinäytteen tutkimiseen ja seulomiseen kyseessä olevien arseeniyhdisteiden varalta. Tunnistukset tehtiin käyttäen NMR spektroskopian lisäksi nestekromatografia-massaspektrometriaa (LC-MS) ja molemmissa sedimenteissä havaittiin pieniä määriä tutkittuja yhdisteitä sekä muita tunnistamatta jääneitä aromaattisia yhdisteitä, joille pystyttiin määrittämään ainoastaan osarakenteet. Tunnistettujen yhdisteiden joukkoon lukeutui myös DM-hapon johdannaisia, joille ei pH-riippuvuutta oltu määritetty, mutta jotka saatiin tunnistettua luotettavasti kahden menetelmän yhdistelmällä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia, NMR, kemiallinen siirtymä, kemiallisen siirtymän mallintaminen, aromaattiset arseeniyhdisteet, VERIFIN, Itämeren sedimentit			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Helsingin Yliopiston digitaalinen arkisto E-Thesis			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällys

1. Johdanto	3
2. NMR-spektroskopian perusteet ¹	5
3. Kemiaallinen siirtymä	14
3.1. Yleistä kemiallisesta siirtymästä ¹	14
3.2. Yleistä kemiallisiin siirtymiin vaikuttavista parametreista	23
3.2.1. Rakenteelliset ja avaruudelliseen suuntautumiseen liittyvät tekijät	26
3.2.2. Liuotin	38
3.2.3. Vuorovaikutukset	40
3.2.4. Konsentraatio, pH ja ionivahvuus	50
3.2.5. Lämpötila.....	70
3.3. Yhteenveto parametrien vaikutuksesta kemiallisiin siirtymiin	74
4. Yleistä kemiallisen siirtymän ennustamisesta	76
5. Kemiallisten siirtymien ennusteiden tekoon liittyvät ongelmat ja haasteet	79
6. Ennusteiden sovellukset nykyään sekä kehitysmahdollisuudet tulevaisuudessa	82
7. Siirtymien ennustamiseen käytetyt laskennalliset menetelmät.....	86
7.1. Yleistä laskennallisista menetelmistä.....	86
7.2. Empiiriset menetelmät	92
7.2.1. Tietokantojen käyttö.....	92
7.2.2. Inkrementaaliset menetelmät.....	96
7.2.3. Neuroniverkot ja geneettiset algoritmit	100
7.3. Kvanttimekaaniset menetelmät	104
7.3.1. Yleistä.....	104
7.3.2. Tiheysfunktionaaliteoria-laskut.....	108
7.3.3. Ab initio -menetelmät.....	111
7.3.4. Koordinaattiriippuvuusongelma	113
7.3.5. Liuottimen ja vetysitoutumisen huomioon ottaminen kvanttimekaanisissa laskuissa	116
7.3.6. Kvanttimekaanisten menetelmien vertailua toisiinsa ja muihin laskennallisiin menetelmiin	118
7.4. Semi-empiiriset menetelmät	120

8. Kirjallisuuskatsauksen yhteenveto.....	122
Käytännön osuus.....	124
9. Tavoitteet ja yleistä käytännön osuudesta	124
10. Laitteisto ja ohjelmistot	125
11. pH-mittaus metanolissa.....	127
12. Puhdasaineisiin kohdistuvat tutkimukset.....	131
12.1. Arseeniyhdisteiden kantaliuosten valmistus	131
12.2. Adamsiitin arsiinihapon puhdasainetutkimuksen	135
12.3. Adamsiitin arsiinihapon reaktiotuotteen tutkimukset	150
12.4. Muiden aromaattisten arseeniyhdisteiden pH-sarjojen valmistus ja tarkastelu	156
13. Sedimenttinäytteisiin kohdistuneet tutkimukset	164
13.1. Sedimenttinäytteiden valmistus	164
13.2. Sedimenttinäytteiden tutkiminen	170
13.2.1. Aromaattisten arseeniyhdisteiden etsiminen sedimenttinäytteistä NMR-spektroskopiolla	170
13.2.2. Aromaattisten yhdisteiden etsiminen sedimenttinäytteistä kaasukromatografia-massaspektrometrialla	178
13.2.3. Aromaattisten yhdisteiden seulominen sedimenttinäytteistä nestekromatografia-massaspektrometrialla	180
14. Yhteenveto	190
16. Viitteet	192
17. Liitteet.....	191

1. Johdanto

Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia (engl. nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR spectroscopy) on yksi tärkeimpiä rakennetutkimuksen kemian analyysitekniikoita. Siinä hyödynnetään atomiytimen vuorovaikutusta ulkoiseen magneettikenttään kuvaavaa fysikaalista suuretta nimeltä spin, joka riippuu ytimen protonien ja neutronien lukumäärästä. NMR-spektrometrillä voidaan havaita atomin ytimen omaavan spinin värähtely eli resonanssi, kun spin on nolasta poikkeava. Resonanssin taajuus on erittäin herkkä ympäröivän molekyyli­rakenteen elektroniympäristölle, eli varjostukselle, ja siitä käytetään myös nimitystä kemiallinen siirtymä. Näin ollen NMR-spektrometrillä voidaan saada atomitasen erotuskyvyllä rakennetietoa näytteen sisältämistä yhdisteistä ja tätä tietoa voidaan soveltaa tutkimuksessa eri tavoin.

Havaitun resonanssin kemiallista siirtymää voidaan käyttää työkaluna muun muassa aineiden rakenne-analytiikassa sekä tuntemattomien yhdisteiden analyysissä näyteseoksia tutkittaessa. Ympäristön pienetkin muutokset saattavat vaikuttaa ytimen varjostukseen ja muuttaa siirtymän arvoa, joten siirtymän muutoksen perusteella saadaan tietoa esimerkiksi mahdollisista näytteen pH:n muutoksista sekä tutkitun yhdisteen näytteessä läsnä olevista konformaatioista ja isomeereistä. Siirtymän arvon riippuvuus eri parametreista mahdollistaa sekä tutkitun yhdisteen että näyteolosuhteiden tutkimisen yksityiskohtaisesti. Siirtymiin vaikuttavia tekijöitä on lukuisia ja niistä huomattavimmat ovat liuotin, erilaiset heikot vuorovaikutukset, konsentraatio, pH, ionivahvuus, lämpötila sekä yhdisteen rakenteeseen ja suuntautumiseen liittyvät muutokset, kuten konformaatio, tautomeria, aggregaatio ja mahdollisesti polymeroituminen.

Kemiallisen siirtymän arvon mallintamiseksi ja siirtymään vaikuttavien parametrien tutkimista helpottamaan on kehitetty lukuisia laskennallisia menetelmiä. Niiden avulla on mahdollista selvittää erilaisia spektriparametreja, joiden pohjalta varsinaiset siirtymät sekä yhdisteen spektri voidaan simuloida. Eri menetelmillä on omat vahvuutensa ja heikkoutensa, mutta niistä useiden avulla on mahdollista ottaa näyteympäristön vaikutus huomioon paremmin kuin puhtaasti kokeellista vertailudataa käytettäessä. Laskennallisista menetelmistä etenkin kvanttimekaaniset menetelmät ovat vallanneet alaa viime vuosina, vaikka empiiristen menetelmien käyttökin on suhteellisen suosittua, kun taas semi-empiiristen menetelmien suosio jäi pieneksi 2000-luvun alulla.

Tutkielman kirjallisuuskatsausosiossa esitellään lyhyesti NMR-spektroskopian perusteita, kemialliseen siirtymään vaikuttavia rakenteellisia ja yhdisteen ympäristöön liittyviä ulkoisia tekijöitä ja niiden vaikutusta siirtymiin sekä käydään läpi erilaisia kemiallisen siirtymän ennustukseen liittyviä menetelmiä. Lyhyesti käsitellään myös spektriparametrien ennustamiseen liittyviä ongelmia, niiden nykyisiä sovelluksia sekä tulevaisuuden kehitysmahdollisuuksia.

Käytännön osuudessa käydään läpi erilaisten aromaattisten arseeniyhdisteiden protonien kemiallisten siirtymien pH-käyttäytymisen tutkimusta ja tuloksia sekä sovelletaan saatua tietoa ympäristönäytteiden tutkimiseen. Osiossa esitetään sekä NMR:llä että muilla analyttisillä menetelmillä tehtyjä tutkimuksia, joiden perusteella johtopäätöksiä näytteiden sisältämistä yhdisteistä tehtiin.

2. NMR-spektroskopian perusteet¹

Ydinmagneettinen resonanssispektroskopia antaa informaatiota tutkitun yhdisteen rakenteesta ja sillä voidaan tuottaa tutkitun näytteen spektri, joka koostuu näytteen sisältämien yhdisteiden NMR-aktiivisten ytimien määrätyillä kemiallisilla siirtymillä esiintyvistä resonansseista. Siirtymä voidaan selittää atomiytimien ominaisuuksilla, kuten spinkvanttiluvulla, kulmamomentilla ja gyromagneettisella vakiolla. Näistä spinkvanttiluku vastaa ytimen alkeishiukkasrakennetta, kulmamomentti sen liikettä ja gyromagneettinen vakio kahden edellä mainitun suhdetta. Ytimen ominaisuuksien johdosta näytteessä olevia spin-aktiivisia ytimiä voidaan kuvata kokonaismagnetisaatiolla, jota vastaavaan vektoriin voidaan vaikuttaa koordinaatistossa säteilyttämällä näytettä sopivalla radiotaajuudella. Tällöin vektorin liikettä magneetikentässä voidaan havainnoida sopivalla radiovastaanotinjärjestelmällä. Toisin sanoen säteilytyksen yhteydessä ytimet absorboivat niille ominaista taajuutta, jonka emissiota seurataan NMR-kokeen aikana.

Atomiydin on jatkuvassa pyörimisliikkeessä oleva kappale, jolla näin ollen fysiikan lakien mukaan on sille ominainen kulmamomentti P (eng. angular momentum), jota kutsutaan myös nimellä spin. Spinin arvojen laskemista varten ytimen oletetaan olevan klassisten mallien mukaisesti pyöreä, jolloin kappaleeseen liittyvät laskut helpottuvat, sillä tällöin kulmamomentilla voidaan yksikertaisesti kuvata kappaleen liikettä oman akselinsa ympäri. Kulmamomentti saa kvantittuneita arvoja, jotka voidaan laskea kussakin tapauksessa käyttäen tutkittavan ytimen spinkvanttilukua I (Yhtälö (1)), joka on ytimen rakenteeseen liittyvä suure. Yhtälössä (1) \hbar on redusoitu Planckin vakio, joka saa arvon $\hbar = h/(2\pi)$.

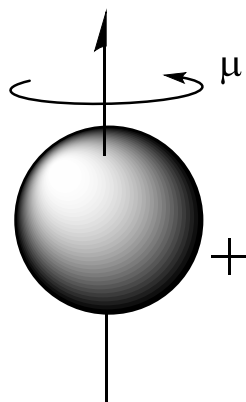
$$(1) \quad P = \sqrt{I(I+1)}\hbar$$

Spinkvanttiluvun arvoon vaikuttaa ytimen koostumus, koska arvo muuttuu protonien ja neutronien vuorovaikutusten määrän myötä. Ytimille, joilla sekä protonien että neutronien lukumäärä on parillinen, spinkvanttiluku on nolla, mutta muulloin se saa Taulukon 1 mukaan nolasta poikkeavia arvoja $\frac{1}{2}n$ monikertana ($\frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$).

Taulukko 1: Spinkvanttiluvun I määräytyminen ytimen protoni-neutronikoostumuksen mukaan

Protonien määrä	Neutronien määrä	Spinkvanttiluku
Parillinen	Parillinen	0
Pariton	Pariton	Kokonaisluku (1, 2...)
Parillinen	Pariton	Murtoluku ($\frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \dots$)
Pariton	Parillinen	Murtoluku ($\frac{1}{2}, \frac{3}{2}, \dots$)

Ytimellä on myös magneettinen momentti μ , jota voidaan nimittää lisäksi magneettiseksi dipolimomentiksi tai lyhyemmin vain dipolimomentiksi. Nämä nimet perustuvat sille, että magneettisen momentin vuoksi ydin toimii dipolina, joka voidaan käsittää eräänlaisena magneettina ja joka pienen massansa vuoksi vastaa nopeasti ulkoisen magneettikentän muutoksiin.



Kuva 1: Ytimen, joka on positiivisesti varautunut kappale, pyörimistä oman akselinsa ympäri kuvataan ominaisuudella spin. Pyörimisen johdosta ydin saa magneettisen momentin μ , joka johtaa dipoli-luonteeseen

Magneettinen momentti kytkeytyy kulmamomenttiin gyromagneettisen vakion γ kautta (Yhtälö (2)), joka on kullekin isotoopille ominainen ytimen magneettisen momentin ja kulmamomentin suhde. Tämän suhteen suuruus kuvaa sitä, kuinka herkkä NMR on menetelmänä kyseisen ytimen havaitsemiseen, sillä suuremman gyromagneettisen vakion omaavien ytimien mittausherkyys on lähtökohtaisesti parempi kuin pienen vakion omaavien ytimien.

$$(2) \quad \mu = \gamma P = \gamma \sqrt{I(I+1)}\hbar$$

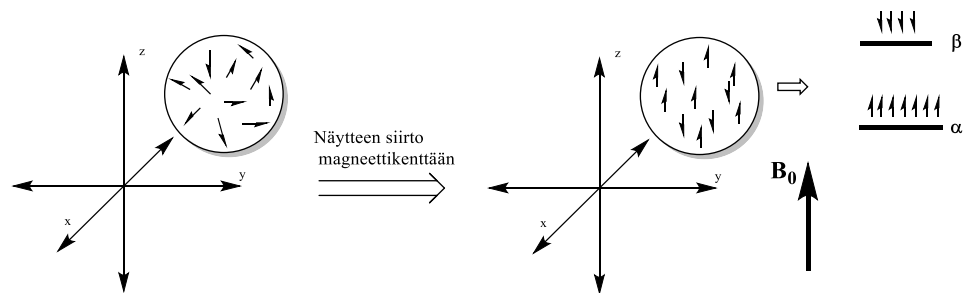
Koska useimpien mitattavien ytimien gyromagneettinen vakio on positiivinen, ovat magneettisen momentin ja kulmamomentin vektorit tyypillisesti samansuuntaisia. Poikkeuksena tähän ovat kuitenkin esimerkiksi ^{15}N ja ^{29}Si ytimet, joiden vektorit ovat vastakkaissuuntaiset negatiivisen gyromagneettisen vakion takia.

Kulmamomentin ja magneettisen momentin kytkös toisiinsa johtaa siihen, että vain ytimet, joiden spinkvanttiluvut poikkeavat nolasta, voidaan havaita NMR-spektroskopialla. Tämä johtuu siitä, että kulmamomentin ollessa nolla myös ytimen magneettinen momentti saa arvon nolla (Yhtälö (2)). Tällöin dipoli ei pyöri ulkoisessa magneettikentässä (Kuva 3), eikä havaittavaa taajuutta ole olemassa. Esimerkkinä tällaisista tapauksista ovat esimerkiksi ^{12}C ja ^{16}O ytimet, joiden tapauksessa atomia tutkitaan havainnoimalla alkuaineen vastaavia isotooppeja, kuten ^{13}C -ydintä.

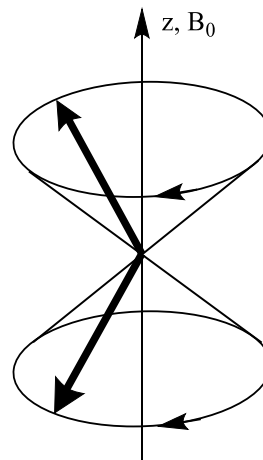
Kun NMR-näytteeseen kohdistetaan ulkoinen magneettikenttä, niin ydinten kulmamomenttien z-akselin suuntaisten komponenttien P_z :n arvot kvantittuvat, jolloin kulmamomentin, ja sen myötä magneettisen momentin, vektorit voivat suuntautua avaruudellisesti vain rajoitetulla tavalla. Mahdollisia orientaatioita on ytimen spinkvanttiluvun mukaan $2I+1$, mikä tarkoittaa, että esimerkiksi $1/2$ -spin ytimille ^1H ja ^{13}C , jotka ovat eräät tyypillisimmistä NMR:llä tarkasteltavista ytimistä, mahdollisia kulmamomenttien suuntautumisia on kaksi (Kuva 2 **Virhe. Viitteen lähde ei löytynyt.**). Normaalitilassaan, eli ollessaan huoneenlämmössä ja ympäristöltään muualla kuin homogeenisessä magneettikentässä, ytimien spinrit eivät ole orientoituneet yhdenmukaisesti, vaan niiden suunnat ovat sattumanvaraisia ja näin ollen magneettisten momenttien summa on nolla.

Kun ulkoisen magneettikentän myötäisesti asemoituneen ytimen magneettista momenttia kuvataan vektorilla, ei se käytännössä ole täysin yhdensuuntainen z-akselin kanssa. Sen sijaan vektori pyörii akselin ympäri toinen pää origossa paikoillaan pysyen (Kuva 3). Tälle pyörimiselle on kunkin ytimen kohdalla olemassa ominainen taajuus, jota nimitetään Larmor taajuudeksi (Yhtälö (3)). Tämän taajuuden energia riippuu

magneettikentän ja magneettisen momentin z-akselin suuntaisen tekijän μ_z suuruudesta (Yhtälö (4)).



Kuva 2: Spinit normaalitilassa sekä ulkoisessa magneettikentässä B_0 . Spinit, tai niiden magneettiset momentit, on esitetty puolikkaina nuolina koordinaatistossa, jonka avulla nähdään, etteivät spinit ole järjestäytyneet yhdenmukaisesti ollessaan magneettikentän ulkopuolella. Kun magneettikenttä kohdistetaan näytteeseen, niin spinkvanttiluvun $1/2$ omaavan ytimien tapauksessa asettuvat spinit kahdelle energiatasolle α ja β , joista edellä mainittu on alhaisempaa energiaa vastaava taso, jolla spinit ovat magneettikentän suuntaisia ja jälkimmäisellä spinit ovat asettuneet kenttää vastaan



Kuva 3: Puoli-spinytimen $I = 1/2$ magnetisaatiovektorin pyöriminen koordinaatistossa ulkoisessa magneettikentässä B_0

$$(3) \quad v_L = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

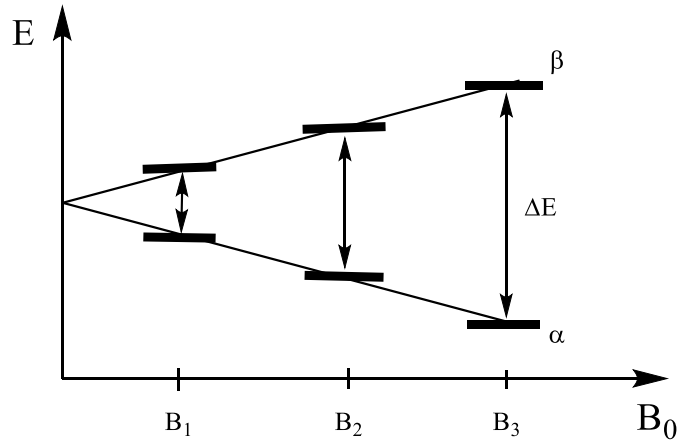
$$(4) \quad E = -\mu_z B_0$$

Kutakin spinin orientaatiota vastaa tietty energiatila (Kuva 2 **Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.**). Näiden energiatilojen välinen kvantittunut energiaero voidaan laskea Yhtälöllä (5), joissa γ on ytimen gyromagneettinen vakio, h on Planckin vakio ja B_0 on ulkoisen magneettikentän voimakkuus.

$$(5) \quad \Delta E = \gamma \hbar B_0 = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi}$$

Ytimillä, joiden spinkvanttiluku on $1/2$, on kaksi energiatilaa, joista perustila α on alempienerginen tila, jolla spin on suuntautunut ulkoisen magneettikentän suuntaisesti ja ylemmän energian omaavassa spintilassa β ytimen magneettinen momentti on ulkoisen magneettikentän vastainen.

Voimakkaamassa magneettikentässä energiatilojen energiaerot ovat suuremmat kuin pienemässä magneettikentässä (Kuva 4), kuten Yhtälöstä (5) nähdään. Tämä johtaa siihen, että suuremmassa kentässä NMR on menetelmänä herkempi, koska silloin suurempi osa spineistä jää alemmalle energiatasolle kasvattaen miehityseroa.



Kuva 4: Energiatasojen α ja β energiaeron ΔE riippuvuus ulkoisen kentän B_0 suuruudesta. Kuvassa $B_1 < B_2 < B_3$

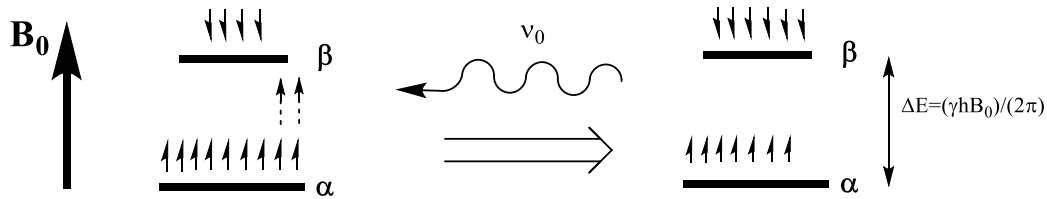
Energiatilojen miehityksellä, eli populaatioilla, tarkoitetaan kutakin tilaa vastaavalla tavalla orientoituneiden ytimien lukumäärää, jota voidaan poikkeuttaa termodynaamisesta tasapainotilasta säteilyttämällä ytimiä tilojen energiaeroa vastaavalla taajuudella (Kuva 5). Käytetyn taajuuden on oltava sama kuin ytimen Larmor taajuus, jotta siirtymä tapahtuisi (Yhtälö (6)). Tätä vaatimusta kutsutaan resonanssiehdoksi.

$$(6) \quad h\nu_1 = \Delta E = \frac{\gamma \hbar B_0}{2\pi} = h\nu_L$$

Atomiytimiä kuvaavien aaltofunktioiden vaihtoon liittyvistä kvanttimekaanisista syistä ytimille, joilla energiatiloja on enemmän kuin kaksi, vain singlettisiirtymät, joille magneettisen kvanttiluvun m muutos on yksi (Yhtälö (7)), on sallittu.

$$(7) \quad \Delta m = \pm 1$$

Spinin poikkeutus alemmalta energiatilalta ylemmälle vaatii energiaa, kun taas muutos toiseen suuntaan vapauttaa sitä. Säteilytyksen seurauksena kahden energiatilan systeemissä spinin siirtyminen energiatilalta toiselle johtaa orientaation muutoksen toiseksi, eli vektorin kääntymisen ympäri koordinaatistossa (Kuva 5). Energiatilojen välisten siirtymien todennäköisyys on yhtä suuri molempiin suuntiin, mutta termodynaamisessa tasapainossa alemman energiatilan ylimiehitys johtaa siihen, että siirtymät ylemmälle energiatilalle ovat dominoiva prosessi, jolloin energiaa absorboituu enemmän kuin sitä vapautuu.



Kuva 5: Kun ydin viritetään radiotaajuudella ν_0 , joka vastaa ytimen Larmor taajuutta, virittyy osa ytimistä ja spinjakauma eri energiatasoilla muuttuu. Kuvassa esitetty siirtymiä puoli-spinytimen energiatilojen välillä

Energiatilojen populaatioiden jakaumaa voidaan kuvata Boltzmannin jakaumalain (Yhtälö (8)) avulla:

$$(8) \quad \frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right)} \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T}$$

Yhtälössä (8) N_α ja N_β ovat vastaavien energiatilojen miehitykset, e on Neperin luku, ΔE on energiatilojen energiaero, k_B on Boltzmannin vakio ja T on lämpötila.

Koska energiatilojen energiaero on tyypillisesti varsin pieni verrattuna lämpöliikkeen energiaa kuvaavaan termiin $k_B T$, ei spinien virittäminen tilalta toiselle ole kovin haastavaa. Tästä huolimatta termodynaamisessa tasapainossa alemmalla energiatilalla on kuitenkin virittämisen jälkeenkin pieni ylimiehitys korkeampaan energiatasoon verrattuna ja alemman tason ylimiehitys on vain miljoonasosan (ppm) luokkaa. Myös muissa näyteolosuhteissa kuin termodynaamisessa tasapainossa nimenomaan energiatasojen miehitysero tuottaa havaittavan signaalin, jonka intensiteettiin vaikuttaa spinien lukumäärä, eli näytteen konsentraatio. Tämän vuoksi signaali ei ole havaittavissa energiatilojen miehityksen vastatessa toisiaan, eli kun $N_\alpha = N_\beta$, jolloin energiatilojen sanotaan olevan saturoituneita.

Kuten aikaisemmin todettiin, eivät ydinten magneettiset momentit suuntaudu täysin z-akselin mukaisesti, vaikka spinien sanotaan asettuvan magneettikentän myötäisesti tai sitä vastaan. Koska ytimiä, ja näin ollen magneettisia momentteja, on NMR-näytteessä runsaasti, kumoavat vektorien transversaalit, eli vektorin x- ja y-koordinaattien suuntaiset tekijät, toisensa ja kokonaismomentiksi jää pelkästään z- akselin suuntainen vektori. Tätä summavektoria kutsutaan magnetisaatiovektoriksi ja se kuvaa näytteen kokonaismagnetisaatiota M .

Termodynaamisessa tasapainossa energiatilojen populaatioerot johtavat siihen, että ulkoisen magneettikentän myötäisiä vektoreita on sitä vastaan asemoituneita enemmän, jolloin myös summavektori on ulkoisen magneettikentän suuntainen. NMR-spektroskopiassa tehtävät kokeet perustuvat sille, että tutkittavien ydinten magnetisaatiovektoriin vaikutetaan erilaisilla pulsseilla, jotka kääntävät vektorin suunnan koordinaatistossa z-akselilta xy-tasolle. Tämän jälkeen vektori pyörii tasolla Larmor-taajuudellaan indusoiden ympäristöön häiriökentän, joka

vaimenee T_1 (spin-ympäristö) tai T_2 (spin-spin) relaksaation kautta. Tämä vapaan vaimenemisen signaali, eli FID (Free Induction Decay) voidaan havaita detektorilla ja muuttaa spektrissä näkyväksi piikiksi Fourier-muunnoksen avulla.

3. Kemiallinen siirtymä

3.1. Yleistä kemiallisesta siirtymästä¹

Kemiallinen siirtymä kuvaa atomiytimen ympäristöä, eli sitä, kuinka paljon elektronit varjostavat ydintä, ja vastaa taajuutta, jolla ydin resonoi emittoidessaan energiaa energiatilojen välisten siirtymien johdosta. Varjostuksella, jota kuvataan yleisesti varjostusvakiolla σ (eng. shielding constant), viitataan ilmiöön, jossa elektronit suojaavat ydintä ulkoisen magneettikentän vaikutukselta. Tämä perustuu elektronien vuorovaikutukseen ulkoisen magneettikentän kanssa, jolloin ytimen ympärille muodostuu ulkoista magneettikenttää vastustava pienempi kenttä. Tämän suojaavan kentän vuoksi ydin kokee ulkoisen kentän suuruuden pienempänä kuin se todellisuudessa on. Ilmiötä kuvaavassa Yhtälössä (9) B_{eff} on ytimen kokema kenttä ja σ on ytimen varjostusvakio.

$$(9) \quad B_{eff} = B_0 - \sigma B_0 = (1 - \sigma)B_0$$

Ytimen varjostukseen vaikuttavat erilaiset tekijät, joiden johdosta ydintä ympäröivät elektronit vuorovaikuttavat ympäristönsä kanssa. Pääasiallinen ytimen elektroniympäristöön vaikuttava tekijä on yhdisteen varsinainen molekyyilirakenne, minkä vuoksi NMR-spektroskopiaa voidaan käyttää rakenneanalyysimenetelmänä.

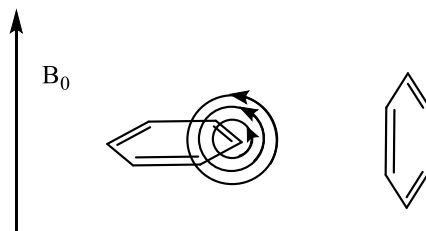
Varjostusta ei pystytä puhtaan teoreettisesti tarkasti laskemaan. Epävarmuus varjostusvakion suuruudessa havainnollistuu nimenomaan spektrin simuloimisen vaikeudessa ja epätarkkuudessa, sillä varjostusvakion laskeminen täydellisesti mahdollistaisi yksiselitteisen siirtymien ennustamisen. Varjostusvakion vaikutus ytimen kokemaan kenttään ja näin ollen ytimen resonanssitaajuuteen otetaan huomioon käyttämällä Larmor-taajuuden Yhtälöä (3) ja huomioimalla siinä ytimen kokema varjostus Yhtälön (10) mukaisesti:

$$(10) \quad \nu = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0 = \nu_L$$

Koska varjostusvakio on nimensä mukaisesti vakio, ei sen suuruus riipu esimerkiksi magneettikentästä. Sen suuruus on noin kokoluokkaa 10^{-5} protoneille, mutta se saa suurempia arvoja painavampien atomien tapauksissa. Tämä johtuu siitä, että suurempi lukumäärä elektroneja varjostaa ydintä enemmän kuin pienempi määrä, joka kevyemmillä atomeilla on ytimensä ympärillä. Suurempi varjostusvakion arvo johtaakin pienempään kemialliseen siirtymään, kuten myöhemmin tässä kappaleessa todetaan.

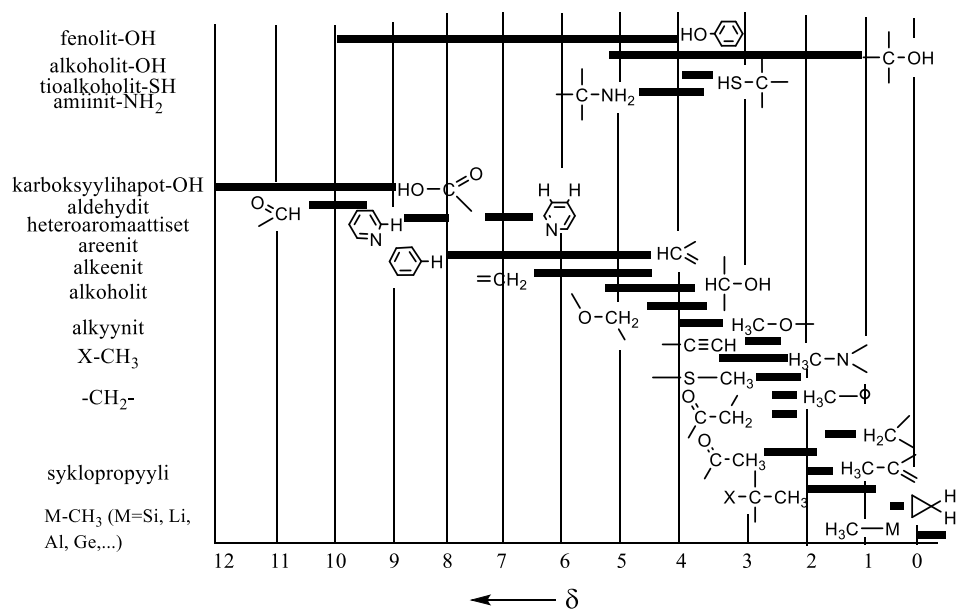
Varjostusvakio koostuu dia- ja paramagneettisista tekijöistä sekä erilaisista korjaustermeistä, joista diamagneettinen tekijä σ_{dia} kuvaa elektronien muodostamaa ulkoista magneettikenttää vastustavaa kenttää. Yksittäiselle atomille, jonka varausjakauma on symmetrinen, tämä termi voidaan laskea klassisten mallien mukaan ja yksielektroniselle systeemille se on pieni, mutta kasvaa arvoltaan elektronien määrän kasvaessa. Klassinen malli ei vastaa todellisuutta molekyylien tapauksessa, koska niiden varausjakauma ei ole symmetrinen ja tulosta on pyrittävä korjaamaan käyttämällä paramagneettista termiä σ_{para} . Tämänkään laskeminen ei ole kuitenkaan

täysin yksiselitteistä, sillä laskuihin vaaditaan esimerkiksi virittyneiden tilojen aaltofunktiot. Korjausta tehdään lisäksi termeillä, jotka kuvaavat esimerkiksi naapuriatomien, rengasanisotropian, rengasvirtauksen (eng. ring. current, Kuva 6) ja intermolekulaaristen vuorovaikutusten vaikutusta varjostukseen.

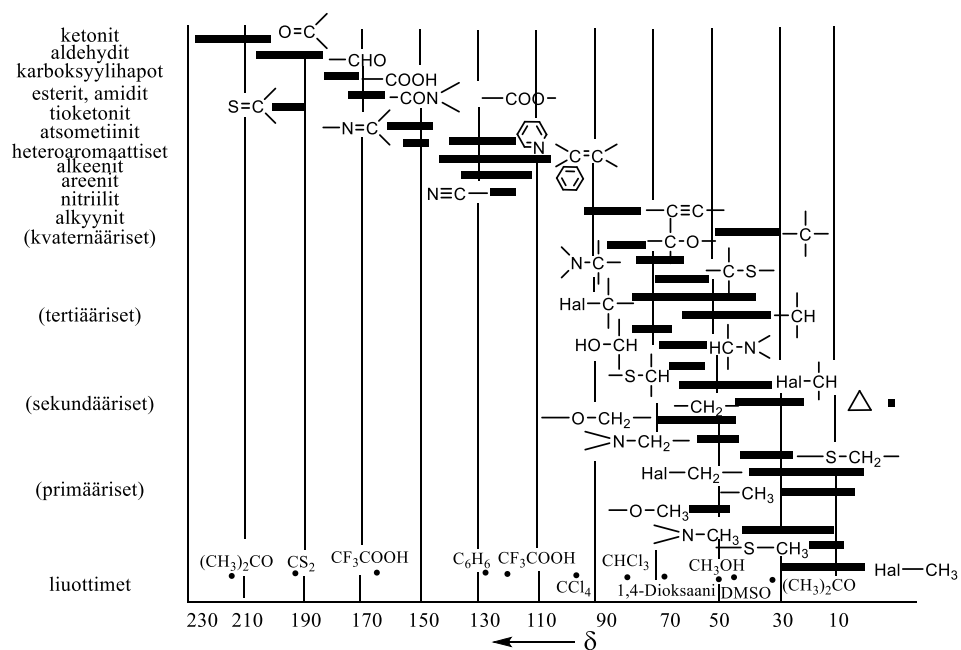


Kuva 6: Aromaattisessa yhdisteessä muodostuva rengasvirtaus ulkoisessa magneettikentässä B_0 . Delokalisoituneet π -elektronit muodostavat ulkoista magneettikenttää vastaan asemoituneen kentän, joka vaikuttaa yhdisteen ytimien varjostukseen. Rengasvirtaus on suurimmillaan yhdisteen ollessa suorassa kulmassa kenttään nähden, kun taas yhdisteen ollessa kentän suuntainen rengasvirtauksen arvo on nolla

Kullekin funktionaaliselle ryhmälle on olemassa sitä vastaavan siirtymän tyypillinen vaihteluväli (Kuva 7 ja Kuva 8), jonka alueella siirtymän kokeelliseen arvoon voivat vaikuttaa monet ulkoiset tekijät, jotka muuttavat tutkittavan ytimen tyypillistä varjostusta.



Kuva 7: Erilaisten rakenteiden tyypilliset siirtymäalueet ^1H NMR spektroskopiassa (kuva piirretty viitteen pohjalta: H. Friebolin, *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd rev. e., 1998.)



Kuva 8: Erilaisten rakenteiden tyypilliset siirtymäalueet ^{13}C NMR spektroskopiassa (kuva piirretty viitteen pohjalta: H. Friebolin, *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd rev. e., 1998.)

Naapuriatomit vaikuttavat ytimen varjostukseen elektronegatiivisuutensa mukaan, sillä tutkittua ydintä elektronegatiivisemmat ytimet vetävät sitä ympäröiviä elektroneja puoleensa pienentäen näin tutkitun ytimen varjostusta. Tällöin ydin värähtelee normaaliin tilaansa verrattuna suuremmalla taajuudella ja kemiallinen siirtymä kasvaa. Toisinaan varjostuksen pienenemiseen liittyvään siirtymän muutokseen viitataan kuvailemalla siirtymän siirtyvän alhaisemman kentän, tai niin sanotun alakentän, suuntaan. Jos tutkittava atomi on sen sijaan sitoutunut itseään elektropositiivisempaan atomiin, on vaikutus päinvastainen, eli varjostus kasvaa, ydin resonoi tavallista pienemmällä taajuudella ja kemiallinen siirtymä pienenee.

Koska ytimen resonanssitaajuus riippuu ulkoisen magneettikentän suuruudesta resonanssiehdon mukaisesti, ei NMR spektroskopiassa käsitellä siirtymiä absoluuttisella asteikolla. Sen sijaan asteikkona käytetään relatiivista asteikkoa, jonka luomiseksi hyödynnetään referenssiyhdisteitä, joiden emissiotaajuuteen tutkittavan ytimen ja referenssiyhdisteen taajuuseroa verrataan:

$$(11) \quad \delta_{obs} = \frac{\nu_{tutkittava\ yhdiste} - \nu_{referenssi}}{\nu_{referenssi}} \times 10^6$$

Yhtälössä (11) δ_{obs} on havaittu kemiallinen siirtymä yksikössä ppm ja ν_n kuvaa tutkittavan tai referenssinä toimivan yhdisteen taajuutta.

Siirtymän numeeristen arvojen yksinkertaistamiseksi käytetään kerrointa 10^6 eli ppm, joka ei kuitenkaan ole varsinaisesti siirtymän yksikkö ja jota ei näin ollen käytetä siirtymään viitatessa.

Tutkittavan yhdisteen ja referenssiyhdisteen taajuuksien eron ($\Delta\nu$) suuruus riippuu ulkoisesta magneettikentästä, mutta koska sitä verrataan referenssiyhdisteen taajuuteen, on kemiallisen siirtymän arvo sama kentästä riippumatta. Tämä johtuu siitä, että referenssiyhdisteen taajuus vastaa käytettävää havainnointitaajuutta ja sen takia Yhtälö (11) voidaan esittää myös vertaamalla $\Delta\nu$:tä laitevalmistajan ilmoittamaan havainnointitaajuuteen (Yhtälö (12)). Tämä yksinkertaistaa käytännön spektrinmittausta, sillä havainnointitaajuuteen verrattaessa vältetään referenssiyhdisteen signaalin tarkan paikan mittaaminen jokaisessa toistettavassa kokeessa.

$$(12) \quad \delta_{obs} = \frac{\Delta\nu}{Havainnointitaajuus} \times 10^6$$

Käytetty referenssiyhdiste, eli standardi, voi olla sisäinen tai ulkoinen. Sisäinen standardi lisätään suoraan näytteen sekaan, kun taas ulkoinen standardi suljetaan erilliseen kapillaariin, jossa sen spektri mitataan samanaikaisesti varsinaisen näytteen spektrin kanssa. Ulkoinen standardi voi olla myös toinen näyte, joka pitää sisällään referenssiyhdisteen samanlaisessa liuottimessa kuin varsinainen näyte. Näistä kahdesta standardityypistä sisäisen standardin käyttö on yleisempää, joskin myös tarkkoja spektrin referointeja voidaan suorittaa määrittämällä spektrissä näkyvälle tunnetulle piikille, kuten liuottimen signaalille, sen tarkka arvo, joka on aikaisemmin määritetty tarkasti vertaamalla sitä standardiin.

Referenssiyhdisteitä on monia. Yksi yleisimmin käytetyistä on tetrametyylisilaani (TMS), jonka kemiallinen siirtymä protonispektrissä saa arvon nolla (δ_H 0.00) Tämä yleisesti sovittu määritelmä ei kuitenkaan aina tarkalleen ottaen pidä paikkaansa, sillä käytännön tutkimuksissa

siirtymässä on todettu lämpötilasta sekä liuottimesta riippuvaa vaihtelua, joka saattaa käytännön spektrimittauksissa vääristää muiden aineiden todellisia siirtymiä, kun niitä verrataan TMS:n siirtymään.^{2,3} Esimerkiksi, kun TMS:n siirtymää verrataan ³He-kaasun värähtelytaajuuteen laimeissa TMS-liuoksissa CD₃Cl:ssa, MeOH-d₄:ssa ja DMSO-d₆:ssa lämpötilavälillä -110,6 – 179,5 °C, on todettu, että kussakin liuottimessa siirtymän riippuvuus lämpötilasta on suunnilleen sama. Riippuvuuden suuruudeksi on esitetty arvoa -0,0006 ppm/°C ja tuloksen toistuminen viittaisi siihen, että TMS:n riippuvuus lämpötilasta olisi sama muissakin kuin tutkituissa liuottimissa.² Toisaalta johtopäätökset TMS:n lämpötilariippuvuuden suuruudesta eivät ole täysin yksiselitteisiä, sillä myöhemmässä tutkimuksessa lämpötilariippuvuuden on todettu poikkeavan arviosta hieman ja siirtymän muuttuvan noin -0,0004 ppm/°C laimeissa liuoksissa, joissa TMS:n ja liuottimen vuorovaikutus on vähäistä.⁴

Referenssiyhdisteen siirtymän muutos saattaa olla pieni, mutta koska myös kohdeyhdisteiden siirtymät liikkuvat toisinaan vain pienissä määrin, on äärimmäisen tärkeää etenkin siirtymiin liittyvää tutkimusta tehdessä, että spektrin referointi suoritetaan tarkasti. Asianmukaisesti käsiteltyjä spektrejä voidaan sittemmin luotettavasti vertailla toisiinsa ja näin kerätä dataa, jonka pohjalta tehdä johtopäätöksiä kemiallisten siirtymien riippuvuussuhteista.

Ytimien kemiallisten siirtymien lisäksi yhdisteelle voidaan myös määrittää spinsysteemi, jonka avulla saadaan entistä enemmän tietoa yhdisteen rakenteesta ja ytimien suhteesta toisiinsa. Spinsysteemi kuvaa sitä, kuinka yhdisteen dipoleina toimivat ytimet vuorovaikuttavat toistensa kanssa muuttaen toistensa kokemaa varjostusta. Nämä vuorovaikutukset havaitaan J-kytkentöinä, joiden vuoksi spektrissä havaittavien resonanssien hienorakenne poikkeaa singletistä, eli yksittäisestä piikistä.

Spinsysteemin ytimiä voidaan kuvata luokittelemalla ne aakkosten mukaan eri ryhmiin siitä riippuen, kuinka paljon niiden siirtymät eroavat toisistaan. Jos esimerkiksi hiileen sitoutunutta protonia kutsutaan A-ytimeksi, niin sen kanssa epäekvivalentti, mutta siirtymältään samankaltainen ydin on B, kun taas esimerkiksi samassa rakenteessa kiinni oleva fosfori- tai fluoriydin, jonka siirtymä on huomattavan erilainen A:han verrattuna, olisi X. Spinsysteemien määrittäminen on tärkeää etenkin kokeellista spektriä tulkittaessa, sillä resonanssien yhdistäminen oikeisiin ytimiin vaatii ymmärryksen yhdisteen spinsysteemeistä ja havaittavista J-kytkennöistä.⁵

J-kytkennän suuruus ilmoitetaan hertseissä (Hz) ja kahden ytimen A ja X keskinäinen kytkentä on aina yhdensuuruinen, eli $J_{AX} = J_{XA}$. Toisin kuin kemiallinen siirtymä, joka on käytännössä magneettikentästä johtuva ominaisuus, J-kytkennän olemassaolo liittyy ytimen magneettisiin ominaisuuksiin. J-kytkennät eivät tyypillisesti ole yhtä riippuvaisia eri parametreista kuin kemialliset siirtymät, mutta yhdisteestä riippuen myös niille on havaittavissa pieniä muutoksia esimerkiksi pH:n muutoksen myötä.

J-kytkennät syntyvät vierekkäisten ytimien polarisaation myötä, eli sen perusteella, miten niiden spinit suuntautuvat magneettikentässä. Vaikka puoli-spinytimille kentän myötäinen suuntautuminen vastaa vähäenergisempää tilaa, niin J-kytkentöjen muodostuessa vierekkäiset spinit asettuvat vastakkaisiin suuntiin. Tällöin esimerkiksi kolmen sidoksen päässä toisistaan sijaitsevien protonien kytkennän merkki on positiivinen.

Tavallisessa protonispektrissä kytkentöjen merkkejä on mahdotonta erottaa toisistaan, mutta tämä voidaan tarvittaessa selvittää erityisten kokeiden avulla. Tällöin kytkennän merkkiä voidaan soveltaa edelleen tarkemmassa rakenne-analyysissä, koska esimerkiksi epäekvivalenttien geminaalisten, eli toisistaan kahden sidoksen päässä sijaitsevien protonien kytkentä toisiinsa on negatiivinen.

Kytkennot havaitaan NMR-spektrissä hienorakenteen muutoksena, kun resonanssi jakautuu lukumäärään $2nI+1$ naapuriytimien lukumäärän n mukaan, jolloin muodostuneen multipletin piikkien intensiteetit määräytyvät Pascalin kolmion mukaan. Tämän vuoksi J-kytkentöjen perusteella voidaan myös määrittää, ovatko ytimet magneettisesti ekvivalenteja, sillä resonanssin multiplisiteetista voidaan päätellä, onko ytimellä sama kytkentä kaikkiin naapuriytimiin vai ei. Kemiaalisesti ekvivalenteilla ytimillä on sama resonanssitaajuus ja magneettisesti ekvivalentit ytimet ovat keskenään kemiallisesti ekvivalenteja sekä jakavat samat kytkennät kaikkiin muihin ytimiin.

3.2. Yleistä kemiallisiin siirtymiin vaikuttavista parametreista

Molekyyliarakenteen lisäksi tyypillisimmät siirtymiin vaikuttavat parametrit ovat liuotin, konsentraatio, pH ja lämpötila. Kaikissa näistä vaikutus perustuu pohjimmiltaan suurilta osin heikkojen vuorovaikutusten määrälle ja muutoksille eri parametrejä muutettaessa. Parametrien vaikutus siirtymään on muutenkin monimutkainen asia, sillä useat parametreista ovat ainakin jollain tasolla myös kytköksissä toisiinsa. Esimerkiksi konsentraation ja pH:n sekä konsentraation ja mahdollisen aggregoitumisen yhteys on syytä muistaa siirtymien muutoksia tarkasteltaessa.

On tyypillistä, että tutkittavan yhdisteen kemiallinen siirtymä muuttuu eri liuottimien välillä ja myös sen riippuvuus muista parametreista, kuten konsentraatiosta on erilaista eri liuottimissa. Osittain liuottimen merkitys näkyy erilaisien rakenteellisten parametrien vaikutuksena, sillä konformaatio, mahdollinen isomeria, aggregaattien muodostus, dimerisoituminen ja suurten molekyylien, kuten proteiinien, tapauksessa laskostuminen ovat läheisesti yhteydessä liuottimen ja näytemolekyylin välisten vuorovaikutusten voimakkuuteen ja määrään. Tekijöiden riippuvuus toisistaan johtaa vaikeuksiin yleistyksien tekemisessä, mutta keskimääräinen yhteenveto erilaisista siirtymään vaikuttavista tekijöistä sekä niiden vaikutuksesta siirtymän arvoon on esitetty kappaleessa ”3.3. Yhteenveto parametrien vaikutuksesta kemiallisiin siirtymiin” Taulukossa 4, sivulla 75.

Eri parametrien muutos vaikuttaa eri ydinten siirtymiin tyypillisesti eri tavoin. Tämän takia näytteen olosuhteiden vaihtuessa yksittäisen ytimen kemiallisen siirtymän muutosta ei voida ennustaa pelkästään saman yhdisteen muiden ytimien siirtymien muutosten perusteella ilman tietoa tutkitun ytimen siirtymistä muissa olosuhteissa.⁶ Yksinomaan siirtymien

muutoksen suuruuden perusteella ei voida esimerkiksi määrittää, mitkä näytteseoksen spektrin resonanssit yhdistyvät samaan molekyyliin. Tämä todetaan muun muassa pH:n yhteydessä, jolloin erityisesti protonien tapauksessa siirtymien muutokset ovat vahvasti riippuvaisia ytimen etäisyydestä yhdisteen protonoituvaan kohtaan. Eri tekijöiden vaikutuksia voidaan pyrkiä minimoimaan eri tavoin, kuten puskureilla tai hallitsemalla näytteen konsentraatiota ja lämpötilaa. Näin voidaan yksinkertaistaa yhdisteiden tunnistamista biologisista ja ympäristönäytteistä, joiden tutkiminen NMR-spektroskopiolla tämän analyysimenetelmän kehittämisen alkuvaiheissa on ollut haastavaa.

Parametrien vaikutus vaihtelee myös aikaskaalasta, eli NMR-spektroskopisen kokeen kestosta, riippuen. Näyteliuoksessa oleva molekyyli on jatkuvassa liikkeessä ja se muun muassa vaihtaa konformaatioita sekä mahdollisesti tautomeerisia muotoja ja muodostaa ja katkaisee heikkoja sidoksia jatkuvasti. Näitä erilaisia muutoksia molekyylin olotilassa voidaan nimittää yleisnimellä ”vaihto”, joka voi nopeudeltaan olla hidasta, eli vievän millisekunteja, keskimääräistä tai nopeaa. Vaihdon nopeus on otettava spektriä mitatessa huomioon, koska erilaiset tasapainovakiot esimerkiksi konformaatioiden sekä sidosten muodostumisten ja katkeamisten välillä johtavat hyvinkin eri näköisiin spektreihin. Vaikutus on havaittavissa erityisesti kemiallisiin siirtymiin liittyen, mutta myös J-kytkennöissä vaikutus voi olla havaittavissa, jos ytimen olotila kokeen aikaskaalassa on erityisen lyhytikäinen.

Kemialliseen siirtymään vaikuttava vaihdon nopeus on helposti havaittavissa. Kun vaihdon nopeus esimerkiksi konformaatioiden A ja B välillä on hidasta NMR-kokeen skaalassa ja molempien konformaatioiden populaatiot ovat saman kokoiset, havaitaan spektrissä kaksi erillistä resonanssia kumpaakin konformaatiota edustavalla erillisellä siirtymällä.

Mitä nopeampaa vaihto on, sitä useammin molekyylin olotila, kuten tässä esimerkissä konformaatio, ehtii muuttua NMR-kokeen aikana. Tällainen nopeudeltaan keskimääräinen vaihto havaitaan piikkien levenemisenä spektrissä, joten pahimmillaan resonansseja ei voida havaita ollenkaan, koska niitä ei voida enää luotettavasti erottaa spektrin taustasta. Piikin leveneminen on suhteessa olomuodossa vietettyyn aikaan. Tämän tapaista viivanleveyden levenemistä havaitaan myös vaihtuvilla protoneilla, jos yhdisteen protonoituminen ja deprotonoituminen liuoksessa on keskimäärin nopeaa kokeen pituuteen nähden.

Vaihdon ollessa nopeaa, eli molekyylin olotilan muuttuessa jatkuvasti kokeen aikana, on spektrissä havaittu resonanssi keskiarvoistettu piikki, jonka arvo vastaa eri olomuotoja edustavien siirtymien populaatioiden suuruudella painotettua keskiarvoa.

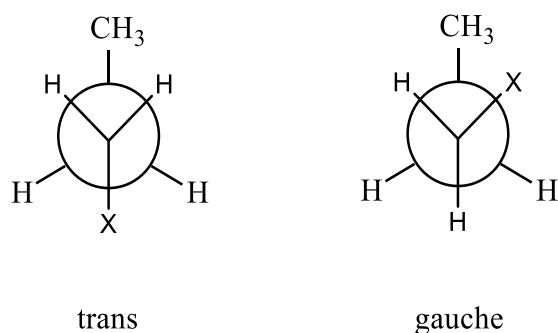
J-kytkennöille aikaskaalan merkitys on havaittavissa samaan tapaan kuin kemiallisille siirtymille, joskin vaikutus nähdään J-kytkentöjen havaittavuutena. Jos ydin pysyy tietyssä olomuodossa, jossa J-kytkentä muodostuu, vain lyhyen aikaa, ei kytkentää havaita spektrissä lainkaan ja siirtymää edustaa vain yksittäinen piikki multipletin sijaan.

3.2.1. Rakenteelliset ja avaruudelliseen suuntautumiseen liittyvät tekijät

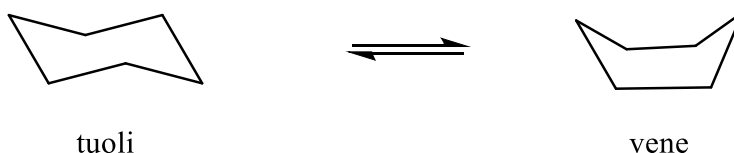
Rakenteellisiksi tekijöiksi voidaan laskea yhdisteen varsinainen rakenne, erilaiset tautomeeriset rakenteet ja avaruudelliset suuntautumiset eli konformaatiot. Varsinaisen rakenteen merkitys havaitaan esimerkiksi substituenttivaikutuksen ja kovalenttisen polymerisoitumisen yhteydessä. Rakenteellisilla tekijöillä on merkitystä kemiallista siirtymää tarkasteltaessa, sillä niiden myötä ytimen elektroninen ympäristö muuttuu. Kaikki edellä mainitut tekijät eivät ole olennaisia kaikille yhdisteille, mutta esimerkiksi konformaation merkitys suurempikokoisille molekyyileille on tyypillisesti sen verran huomattava, että sen huomiotta jättäminen johtaa virheellisiin tuloksiin. Kunkin tekijän merkitys vaihtelee eri yhdisteillä, eikä yksittäisen tekijän vaikutuksen suuruutta kemiallisen siirtymän muutoksen voida pitää viitteenä kaikkien muiden tekijöiden merkityksestä. Tästä esimerkkinä ovat yhdisteet, joille tautomeria ei ole olennainen tekijä, mutta joille samanaikaisesti konformaation vaikutus on huomattava. Yhdisteryhmiä onkin tarkasteltava erillisinä kokonaisuuksina, eikä laajoja yleistyksiä minkään parametrin tarkasta vaikutuksesta voida luotettavasti ja yksiselitteisesti tehdä toisistaan poikkeaville rakenteille.

Useimmilla yhdisteillä mahdollisia konformaatioita on lukemattomia, joskin vain pieni osa niistä on energieettisesti edullisia ja näin ollen läsnä näytteessä. Usein kahden suhteellisen alhaisen energian konformaation väliset kemiallisten siirtymien erot ovat suuret, sillä eri konformaatioissa kunkin ytimen varjostuksen määrä voi vaihdella merkittävästikin rakenteen avaruudellisen suuntautumisen muuttumisen takia.

Useiden mahdollisten konformaatioiden merkitys nousee esille varsinkin tarkasteltaessa kokeellisia spektrejä ja niitä verrattaessa laskennallisiin siirtymien arvoihin,⁷ vaikka jo puhtaasti laskennallisesta datasta nähdään, että esimerkiksi torsiokulman muuttuminen (Kuva 9) vaikuttaa siirtymään merkittävässä määrin.^{8,9} Konformaation merkitys korostuu myös tapauksissa, joissa tietyt konformaatiot aiheuttavat muita enemmän jännitteitä (Kuva 10). Etenkin hiilispektrin resonanssien arvot pienenevät sen mukaan, mitä jännittyneempi rakenne on.¹⁰ Tyypillisesti rengasrakenteiden konformaation muutoksissa ^{13}C -siirtymien muutokset ovat usein suuria, noin 3-7 ppm:n luokkaa.¹¹



Kuva 9: Suhteellisen jännityksettömän rakenteen, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$:n, jossa $\text{X}=\text{CH}_3$, OH tai Cl , Newmanin projektio konformaation muutoksesta torsiokulman muuttuessa. Trans-konformaatio on energeettisesti gauche-vaihtoehtoa edullisempi ja X :n ollessa CH_3 tai Cl yhdisteen CH_3 :n siirtymä pienenee, kun taas vaikutus on päinvastainen X :n ollessa OH ⁹



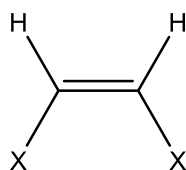
Kuva 10: Sykloheksaanin tuoli- ja venekonformaatiot, joista venekonformaatio on jännittyneempi

Jos rakenne ei ole steerisesti kovin estynyt, on konformaation muutos nopeaa. Tämän vuoksi todelliset siirtymät vastaavat harvoin puhtaasti yhden konformaation siirtymiä ja ovat sen sijaan paremmin kuvattavissa painotetulla keskiarvolla, etenkin tapauksissa, joissa kokeen kesto on moninkertainen konformaation muutokseen vaadittavaan aikaan verrattuna.^{12,13} Ennustettujen siirtymien arvot ovat keskimäärin tarkempia, kun laskuihin käytetään kohdemolekyylin dynamiikan huomioon ottavaa keskiarvoa.¹⁴ Tämä voidaan tehdä laskemalla tarkasti vapaan energian arvot tutkitun yhdisteen eri konformaatioille ja niitä erottavalle energiakynnykselle, minkä jälkeen saatuja tuloksia voidaan käyttää sopivien siirtymien painotusarvojen löytämiseksi ja asianmukainen keskiarvoistaminen voidaan suorittaa.^{15,16} Tyypillisesti keskiarvoistaminen suoritetaan erilaisten laskennallisten menetelmien yhdistelmillä ja tulokset korjataan kokeellisiin tuloksiin perustuvien epälineaaristen menetelmin.¹⁷

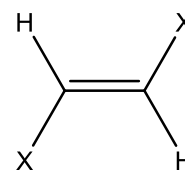
Vaihtoehtoisesti ja yksinkertaisemmin konformaatiot voidaan ottaa huomioon pelkistämällä ne esimerkiksi kahdeksi pysyvimmäksi malliksi ja käyttämällä näiden rakenteeseen perustuvia arvoja laskuissa. Luonnollisestikaan tämä ei tarjoa yhtä tarkkoja arvioita kohdemolekyylin todellisesta käyttäytymisestä kuin keskiarvoistaminen, mutta se on silti varsin yleinen toimintatapa nopeutensa ja laskennallisen yksinkertaisuutensa vuoksi.¹³

Kahden hyvin samantyyppisen isomeriamuodon, cis/trans- ja E/Z-isomerian (Kuva 11), tapauksessa siirtymien erot ovat huomattavat, eikä isomeriaa näin ollen sovi jättää laskuista. Esimerkiksi kuusirenkaisten tyydyttyneiden oksiimien tapauksessa ekvatoriaalisen alfa-protonin siirtymä on jopa 0,9-1,0 ppm korkeampi syn- kuin anti-puolella (Kuva 12).¹⁸

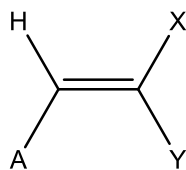
Vaikka E/Z-isomeriaa käytetään pääasiassa alkeenien isomerian kuvaamisessa, voidaan määritelmää laajentaa kattamaan muitakin kaksoissidoksia, joiden substituentit ovat epäidenttisiä keskenään. E/Z-isomerian vaikutus nähdään esimerkiksi 2-nitrobensoehapon tapauksessa, joka esitellään tarkemmin dimerisoitumisen yhteydessä myöhemmin tutkielmassa (Kappale ”3.2.3. Vuorovaikutukset”**Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.**, sivu 43**Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.**)¹⁹ Sen lisäksi, että isomeerien toisiaan vastaavien ydinten kemiallisten siirtymien arvot eroavat tyypillisesti toisistaan, voi myös niiden riippuvuus esimerkiksi konsentraatiosta vaihdella suuresti.²⁰



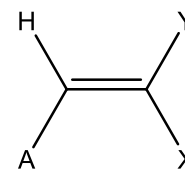
cis



trans

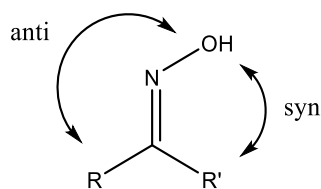


E



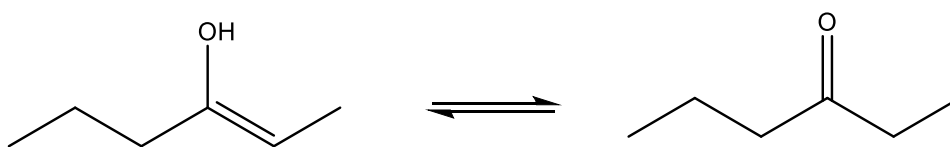
Z

Kuva 11: Cis/trans ja E/Z-isomeria. Kuvassa esitetyt isomeerit alkeenien tapauksessa, kun X, A ja Y kuvaavat eri substituenttiryhmiä. Esitettyjen substituenttien raskausjärjestys kuvassa on $X > A > Y$



Kuva 12: Oksiimin rakenne, jossa esitettyä hydroksyyli ryhmä on R:ään nähden anti- ja R':uun nähden syn-asemassa¹⁸

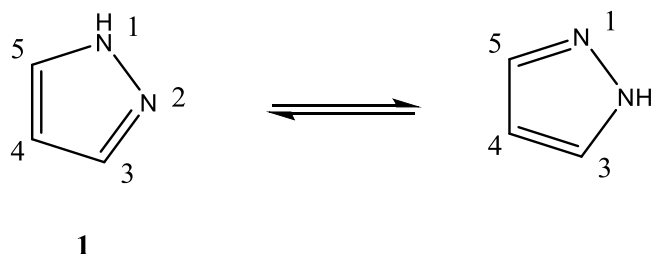
Eri tautomeerien vuorovaikutus toistensa sekä liuotinmolekyylien kanssa voi vaihdella huomattavasti. Se onkin huomioitava, kun tutkitaan yhdisteitä, jotka esiintyvät useammassa erilaisessa tautomeerisessä muodossa. Tämä johtuu siitä, että eri muodoissa molekyylin kyky ja taipumus ottaa osaa heikkoihin vuorovaikutuksiin voi vaikuttaa ydinten varjostukseen vuorovaikutusten määrän ja tyyppin mukaisella tavalla. Esimerkiksi keto-enoli tautomerian myötä (Kuva 13) molekyylin taipumus muodostaa vetysidoksia sekä intra- että intermolekulaarisesti on nähtävissä, jos tautomeerien populaatioiden erot näytteessä ovat suuret.²¹



Kuva 13: 3-heksanonin keto-enoli tautomeriset muodot

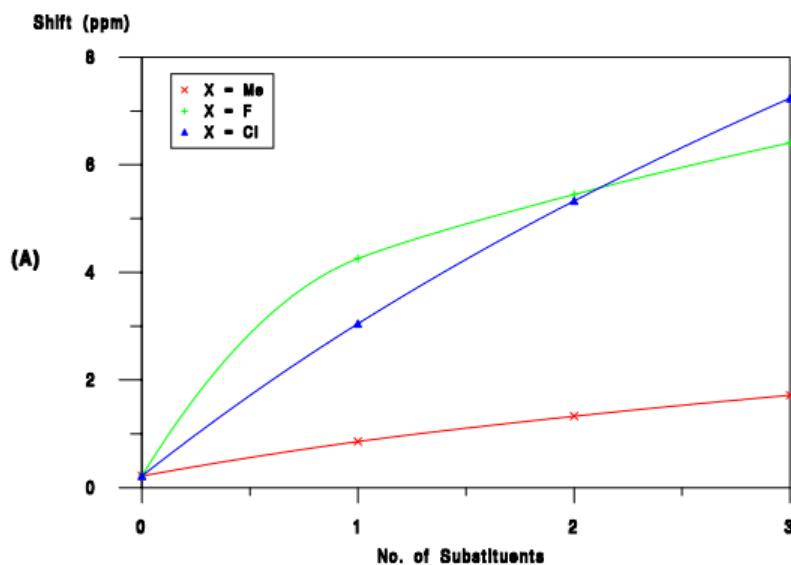
Tautomeria ei vaikuta kaikkien yhdisteiden kemiallisiin siirtymiin, mutta silloinkin ytimet voivat olla herkkiä muille muutoksille. Tästä hyvänä esimerkkinä ovat substituoitumattomat pyratsolit (Kuva 14), joiden C4 -signaali ei riipu tautomeriasta, mutta on todistetusti herkkä liuotinvaiikutukselle. Lisäksi pyratsolien tapauksessa on todettu, että

liuottimen vaikutus on pienempi 3,5-disubstituoituille pyratsoleille kuin substituoimattomille molekyyleille.¹⁶

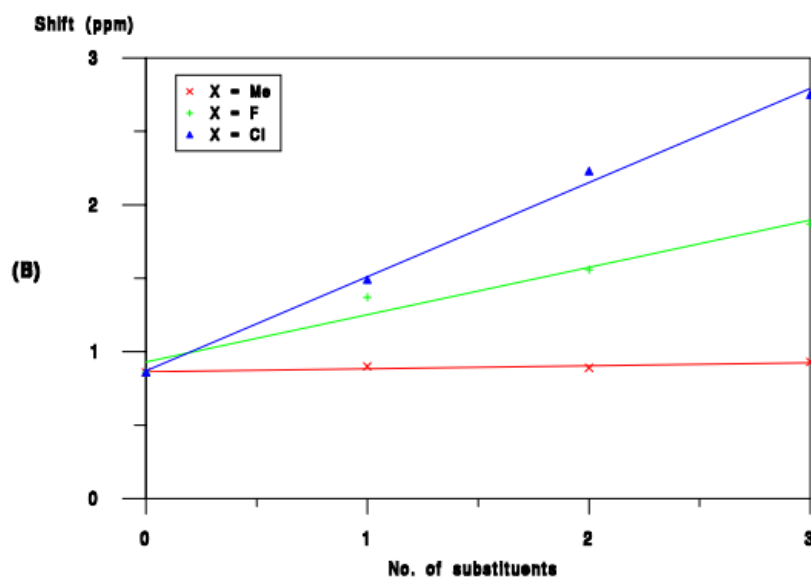


Kuva 14: Pyratsolin rakenne ja numerointi¹⁶

Substituenttiryhmät ja niiden määrä vaikuttavat erityisesti avaruudellisesti ja rakenteellisesti läheisten ydinten varjostukseen, joten substituenttivaikutus on helposti havaittavissa etenkin protonispektrissä. Substituenttien vaikutus voi toisinaan yltää oletettua kauemmas, erityisesti jos kyseessä on konjugoitunut rakenne. Yleisesti johdonmukainen päätelmä on, että mitä elektronegatiivisempi substituentti on, sitä pienempi on sitä lähellä olevien ydinten varjostus, koska tällöin substituentti vetää elektroneja puoleensa muita ytimiä voimakkaammin. Esimerkiksi laskennallisesti on osoitettu, että alifaattisten yhdisteiden halogeenisubstituenttien määrän kasvaessa yhdisteen protonien siirtymät kasvavat. Metyyli­substituentin tapauksessa yhtä suurta muutosta ei olla samassa yhteydessä havaittu, joskin silloinkin muutos oli nähtävissä substituoitun metaanin tapauksessa (Kuva 15 ja Kuva 16).²²



Kuva 15: CH_{4-n}X_n :n substituenttien aiheuttama CHARGE -ohjelmistolla laskettu muutos metyylin protonien signaaleihin. (Kuva R. J. Abraham, M. Edgar, R. P. Glover, M. A. Warne ja L. Griffiths, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 333–341.)

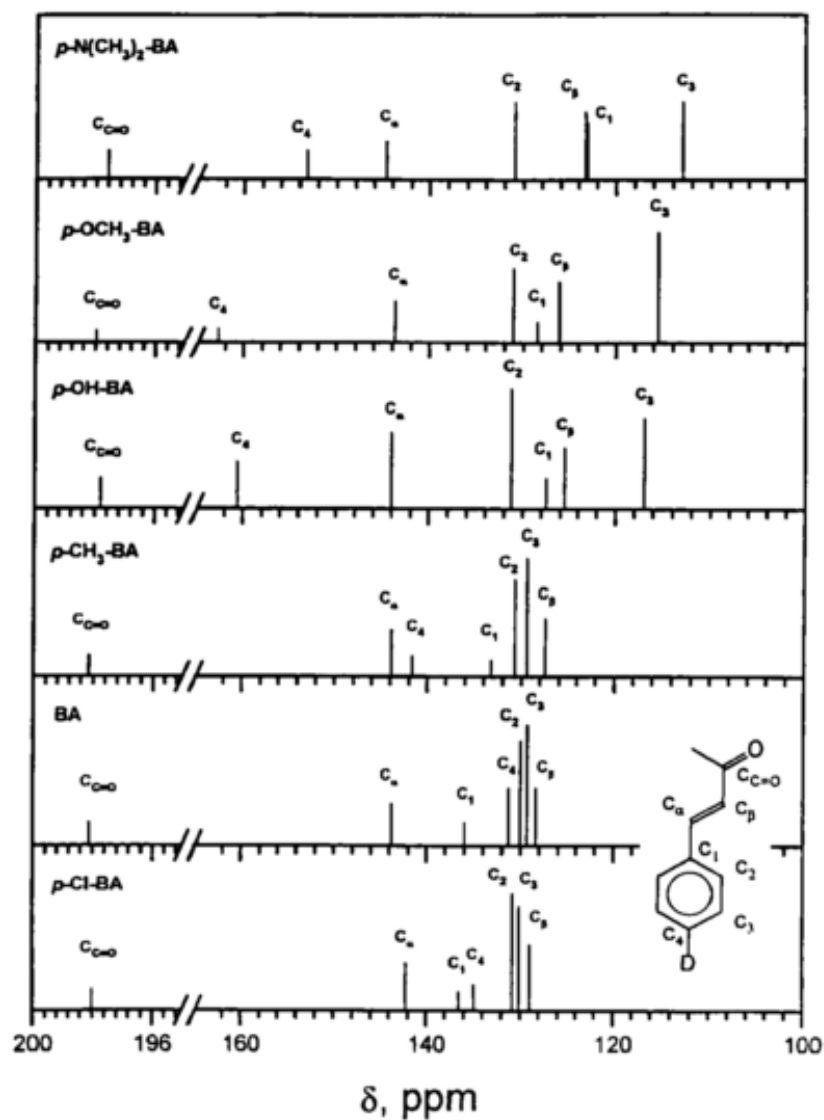


Kuva 16: CH₃CH_{2-n}X_n :n substituenttien aiheuttama CHARGE-ohjelmistolla laskettu muutos substituentista kahden sidoksen päässä olevien protonien siirtymiin. (Kuva R. J. Abraham, M. Edgar, R. P. Glover, M. A. Warne ja L. Griffiths, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 333–341.)

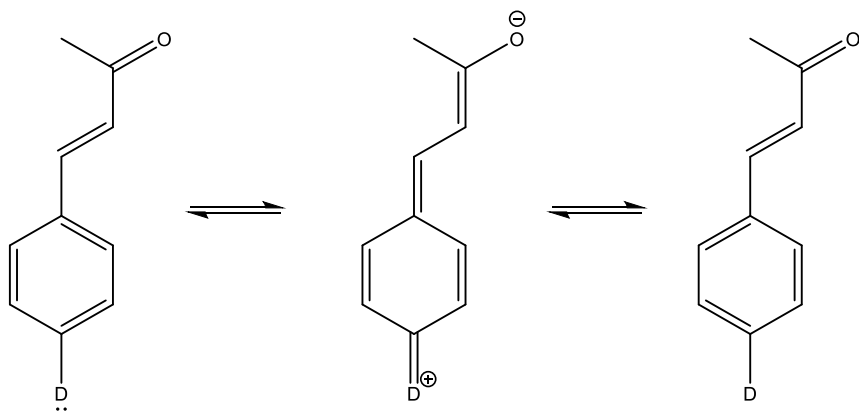
Joidenkin yhdisteiden resonanssirakenteet mahdollistavat substituenttivaikutuksen näkymisen pidemmällä etäisyydellä kuin tavallisesti. Tämä on totta esimerkiksi erilaisten bentsylideeniasetonijohdannaisten tapauksessa, jolloin para-asemassa olevalla substituentilla voi olla merkittävä vaikutus molekyylin hiilispektrin siirtymiin (Kuva 17). On todettu, että elektroneja luovuttavat substituentit para-asemassa johtavat siirtymien muutoksiin suurellakin etäisyydellä. Tämä johtuu pääosin bentsylideeniasetonien resonanssirakenteista (Kuva 18). Tällöin substituenttiin sitoutuneen hiilen siirtymä vaihtelee epälineaarisesti substituentista toiseen ja siihen nähden meta-asemassa olevan hiilen, kaksoissidoksen alfa-hiilen sekä karbonyylihiilen siirtymät pysyvät käytännössä vakioina substituentista riippumatta, kun taas loppujen hiilten siirtymät riippuvat lineaarisesti elektronivaraustiheyden (eng. charge density) summasta sekä kokeellisista arvoista a ja δ° , jotka täytyy määrittää kullekin ytimelle erikseen (Yhtälö (13)).²³

$$(13) \quad \delta = a q_{AM1} + \delta^\circ$$

Yhtälössä (13) q_{AM1} on semi-empiirisellä AM1-metodilla laskettu ytimen nettovaraus.



Kuva 17: Bentsylideeniasetonin (BA) rakenne sekä erilaisten bentsylideeniasetonijohdannaisten hiilispektri deuteroidussa asetonissa huoneenlämmössä (Kuva R. G. E. Morale ja M. A. Leiva, *Spectrosc. Lett.*, 1997, **30**, 557–565)



Kuva 18: Bentsylideeniasetonin resonanssirakenteet

On todettu, että jännityksettömissä rengasrakenteissa metyyli substituenttien vaikutusta siirtymiin voidaan ennustaa empiirisin menetelmin, mutta tällöin virhettä aiheuttaa muun muassa koordinaattiriippuvuusongelma (eng. gauge-problem, ks. sivu 113), jonka kuvaaminen samalla menetelmällä on haastavaa.¹⁰ Tarkemmin koordinaattiriippuvuusongelmasta puhutaan kvanttimekaanisten mallien yhteydessä, sillä se on otettava huomioon erityisesti kyseisiä malleja sovellettaessa.

Aromaattisen renkaiden tapauksessa substituenttien aiheuttaman muutoksen havaitsemisessa on pieni epävarmuus, joka johtuu yhdisteen molekulaarisen tilavuuden (eng. molecular volume) muuttumisesta substituenttien määrän kasvaessa. Tämä tilavuuden muutos johtaa pieniin eroihin konsentraatiossa, joka puolestaan saattaa aiheuttaa kemiallisten siirtymien muutosta pienemmiksi.

Polynaftaleenien substituenttien protonisiirtymiä tutkittaessa on todettu substituenttien protonisiirtymien kasvavan metyyli substituenttien määrän kasvaessa ja muutoksen suuruuden riippuvan muiden substituenttien

asemasta mitattuun ytimeen nähden. Myös aromaattisen renkaan protonien siirtymät pienenevät metyyli substituenttien määrän kasvaessa, sillä substituentit muuttavat renkaan varausjakaumaa.²⁴

Joillain yhdisteillä on taipumusta dimerisoitua tai jopa polymerisoitua liuoksissa muodostamalla vastaavien näytemolekyylien kanssa suurempia kokonaisuuksia. Tässä tutkielmassa dimeereillä ja polymeereillä viitataan nimenomaan kovalenttisin sidoksin muodostuneisiin kokonaisuuksiin,¹⁹ kun taas heikoin vuorovaikutuksin, kuten vetysidoksin tai π -pinoutumisen kautta, koostuneisiin kasautumiin viitataan aggregaatteina, vaikka toisinaan tieteellisissä julkaisuissa niitä nimitetään myös dimeereiksi.^{25,26,27} Polymeroitumisreaktioilla on niille tyypilliset tasapainovakiot ja reaktioiden todennäköisyys riippuu siis suurilta osin monomeerin konsentraatiosta liuoksessa (Yhtälöt (14) ja (15)).

Useimmissa tapauksissa kovalenttinen dimerisoituminen pienentää sidoksen muodostavien ja sen läheisyydessä olevien ydinten kokemaa varjostusta ja näin ollen kemiallisen siirtymän muutos on positiivinen, eli siirtymän arvo on dimeerille suurempi kuin monomeerille.¹⁹ Tämä ei kuitenkaan pidä paikkaansa, jos monomeerit ovat aromaattisia ja dimeeri kooltaan suuri, jolloin aromaattiset osat voivat π -pinoutua tai muuten asettua avaruudellisesti toistensa lähelle ja lisätä näin ydinten varjostusta. Jos dimerisoituminen on suhteellisen hidasta, nähdään se spektrissä monomeerin resonanssien intensiteetin pienenemisenä samalla, kun dimeerin piikkien intensiteetti kasvaa samassa suhteessa.¹⁹ Muutos siirtymässä riippuu siis polymerisoituvan yhdisteen rakenteesta ja monomeerien määrästä muodostuvassa rakenteesta.

Dimerisoitumisen vaikutus siirtymiin riippuu paljolti tutkitusta yhdisteestä ja empiiriset yhtälöt, joilla muutoksen suuruutta tai dimeerin siirtymää voidaan laskea, sopivat yleisesti ottaen lähinnä tarkasti rajatuille yhdistejoukoille tai vähintään rakenteellisesti toisiaan muistuttaville yhdisteille. Esimerkiksi puriinin dimerisoitumisen tutkimisen yhteydessä on dimeerin ja monomeerin siirtymien väliselle erolle on esitetty Yhtälöä (14 **Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.**):

$$(14) \quad \sqrt{\Delta\sigma/C_0} = \sqrt{2K/\Delta\sigma_D} \cdot (\Delta\sigma_D - \Delta\sigma)$$

Yhtälössä (14) $\Delta\sigma$ on havaitun siirtymän ja monomeerin siirtymän ero, $\Delta\sigma_D$ dimeerin ja monomeerin siirtymien ero, K dimerisoitumisreaktion tasapainovakio ja C_0 yhdisteen konsentraatio näytteessä.^{28,29}

Vastaavasti lineaariselle n -meerille siirtymä σ_{Bn} voidaan laskea Yhtälön (15 **Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.**) mukaan, jos oletetaan, että vain lähin naapurimolekyyli vaikuttaa molekyylin ytimien siirtymiin ja että peräkkäisten polymeroitumisreaktioiden tasapainovakiot ovat samat. Tällöin n -meerin päissä sijaitsevien molekyylien ytimillä on samat siirtymät kuin dimeerin vastaavilla ytimillä.²⁸

$$(15) \quad \sigma_{Bn} = [2(n-1)\sigma_{B_2} - (n-2)\sigma_B]/n$$

Yhtälössä (17) σ_B on monomeerin siirtymä.

3.2.2. Liuotin

Liuotin on yksi huomattavimmista tekijöistä,¹⁸ joka vaikuttaa erityisesti protonispektrin siirtymiin. Kemiallisten siirtymien riippuvuus liuottimesta ei ole täysin suoraviivaista, sillä liuottimen vaikutus perustuu osittain muille parametreille, kuten i) näytemolekyylin mieluisimmalle konformaatiolle kyseisessä liuotuksessa, ii) mahdollisen aggregoitumisen tasolle ja nopeudelle sekä iii) muiden heikkojen vuorovaikutusten määrälle ja vahvuudelle. Tämän lisäksi esimerkiksi vuorovaikutuksiin liittyvät muutokset voidaan jakaa tarkemmin osiin vielä sen mukaan, minkä osien välillä vuorovaikutuksia on. Mahdollisuuksia tässä ovat esimerkiksi liuotin- ja näytemolekyylin väliset, näytemolekyylien keskinäiset sekä näytemolekyylien ja epäpuhtauksien väliset vuorovaikutukset. Isojen molekyylien tapauksissa on syytä ottaa huomioon myös intramolekulaariset vuorovaikutukset, jos yhdisteen rakenne sallii sellaisten muodostumisen. Koska vaikuttavia tekijöitä on runsaasti, ei yleisesti voida sanoa olevan olemassa mitään yhtä selkeää fysikokemiallista ominaisuutta, kuten esimerkiksi osittaisvaraus, joka olisi yksiselitteisesti kytköksissä siirtymän suuruuteen.¹⁷ Toisaalta yksittäisissä tapauksissa poikkeuksia on olemassa, sillä esimerkiksi substituotujen alkaanien protoneille on raportoitu korrelaatio siirtymän ja semi-empiirisin menetelmin laskettujen varaustiheyksien välillä.³⁰

Liuottimen valintaan liittyy tiettyjä käytännön vaatimuksia, kuten liuottimen nestemäisenä pysyminen tutkitussa lämpötilassa,¹¹ näytteen liukoisuus valittuun liuottimeen³¹ ja liuotinpiikkien sijainti spektrissä eri alueella kuin tutkitun yhdisteen resonanssit, mutta sen lisäksi etenkin NMR-spektroskopiassa on olennaista, että liuottimen ja analyytin vuorovaikutus otetaan huomioon. Erilaiset heikot vuorovaikutukset vaikuttavat siirtymään eri tavoin, mutta tärkeimmiksi NMR:ssä nousevat

π -pinoutuminen, eli tässä tutkielmassa lyhyemmin ”pinoutumien”, ja vetysitoutuminen. Hydrofobiset vaikutukset voivat johtaa suurenevissa määrin π -pinoutumiseen, joka johtaa suurempaan varjostukseen ja siirtymän pienenemiseen, kun taas vetysitoutumisen vaikutus riippuu tarkasteltavasta ytimeistä. Vetysitoutumisen tapauksessa liuottimen vaikutus on nähtävissä etenkin yhdisteillä, joilla on mahdollisuus sekä inter- että intramolekulaaristen vetysidosten muodostamiseen. Liuottimen ollessa vahva vetysidoksen muodostaja näytteen intramolekulaaristen vetysidosten määrä vähenee ja sidosten vaikutus siirtymään muuttuu tämän mukaan.³² Vuorovaikutusten merkitystä käsitellään tarkemmin kappaleessa ”3.2.3. Vuorovaikutukset”.

Liuotinvaikutus on havaittavissa sekä protoni- että hiili-siirtymissä. Liuottimen vaikutus on kuitenkin yleensä suurempi protonisiirtymiin kuin hiilisiirtymiin,³³ ja alifaattisten yhdisteiden hiilisiirtymissä ei yleensä nähdä merkittävää liuotinriippuvuutta.¹⁸ Siirtymien arvot voivat vaihdella suurestikin eri liuottimien välillä^{16,18} ja esimerkiksi kuuden hiilen tyydyttyneitä renkaita sisältävien rakenteiden aksiaalisten ja ekvatoriaalisten substituenttien protonisiirtymissä on huomattavia eroja eri liuottimissa.¹⁸ Kuten myöhemmin tarkennetaan, voi myös saman yhdisteen siirtymien riippuvuus eri parametreista vaihdella eri liuottimissa. Tämän vuoksi on erityisen tärkeää valita liuotin, jossa analyytin siirtymien käytös tunnetaan hyvin. Liuotinvaikutuksen myötä myös J-kytkennät voivat vaihdella liuottimesta toiseen, sillä etenkin pitkän matkan J-kytkennät saattavat jäädä näkymättömiin eri liuottimissa molekyylin konformaation muutoksen vuoksi.¹⁸

On todettu, että aromaattisissa liuottimissa etenkin aromaattisten protonien kemialliset siirtymät saavat pienempiä arvoja, kun taas liuottimessa, jossa vetysitoutuminen korostuu, muutos on päinvastainen.³⁴ Heikkojen

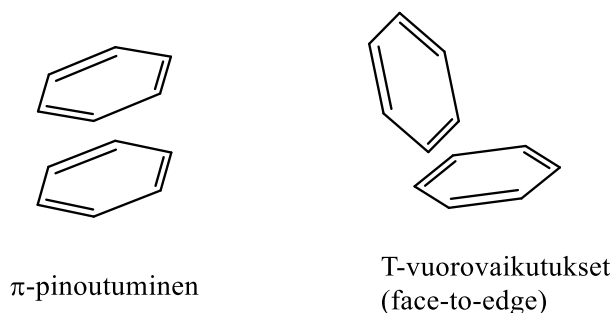
vuorovaikutusten merkitys aromaattisten protonien siirtymiin havaitaan liuottimissa, joissa hydrofobiset vuorovaikutukset aiheuttavat siirtymän arvoa pienentävää π -pinoutumista, jota ei esimerkiksi DMSO:ssa ole havaittavissa.³⁵ Lisäksi aromaattisille yhdisteille on havaittavissa kemiallisen siirtymän pieneneminen polaarisisä liuottimissa, kuten D₂O:ssa, ja muutoksen suuruus pienenee tai kääntyy päinvastaiseksi polaarittomammassa liuottimissa. Tästä poikkeama on DMSO, sillä eri liuotinsarjoja tutkimalla on todettu, että siinä siirtymien muutokset ovat aromaattisille ytimille pieniä, mutta sitä polaarittomammassa liuottimissa vuorovaikutukset vahvistuivat ja kloroformiin siirryttäessä ne ovat jo D₂O:n kanssa samaa luokkaa. Polaarisuudeltaan vaihtelevaa liuotinsarjaa tutkittaessa DMSO:ssa siirtymän muutos oli pienin tai siirtymä sai jopa suurempia arvoja, mutta suunnilleen yhtä suuri sekä sarjan polaarissimassa että polaarittomammassa päässä.³⁶

3.2.3. Vuorovaikutukset

Heikkojen vuorovaikutusten vaikutus siirtymiin tulee esille liuotinvalinnan yhteydessä, mutta se korostuu myös esimerkiksi konsentraatiosta riippuvaisena suurena. Tarkemmin konsentraation merkitystä käsitellään kappaleessa ”3.2.4. konsentraatio, pH ja ionivahvuus”, mutta lyhyesti asiasta keskustellaan jo tässä yhteydessä. Konformaation muutoksen tapaan vuorovaikutusten merkitys näkyy eräänlaisena keskiarvoistettuna siirtymänä, sillä esimerkiksi vetysidosten muodostuminen ja katkeaminen on liian nopeaa NMR:llä puhtaasti havaittavaksi, jos näytemolekyyli ei esiinny puhtaasti sitoutumattomassa tai täysin sitoutuneessa muodossa. Keskiarvoistaminen onkin helposti nähtävissä yhtälöissä, joilla siirtymiä voidaan laskea, sillä niissä havaittu siirtymä lasketaan usein nimenomaan kahta ääripäätä edustavien siirtymien avulla.

Merkittävimmät kemialliseen siirtymään vaikuttavat heikot vuorovaikutukset ovat muun muassa vetysitoutuminen, polaariset tekijät,³⁴ hydrofobiset vuorovaikutukset sekä aromaattisten yhdisteiden tapauksessa π -pinoutuminen. Hydrofobiset vuorovaikutukset voivat näkyä esimerkiksi aromaattisten yhdisteiden pinoutumisena tai muissa tapauksissa misellin muodostumisena.³¹ Heikkojen vuorovaikutusten vaikutusta voidaan kuvailla termeillä kasautuminen tai aggregaatio, sillä niiden johdosta molekyylit eivät ole enää yksittäisinä osina liuoksessa, vaan muodostavat suurempia kokonaisuuksia.

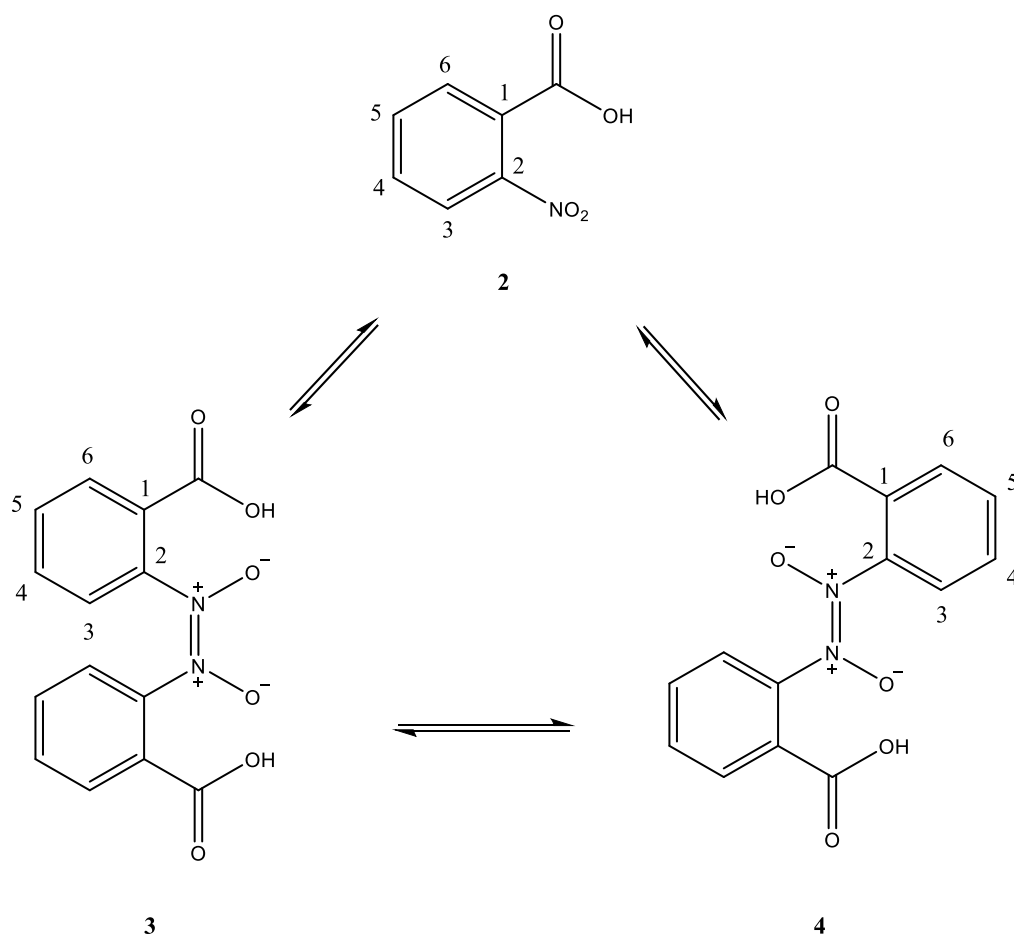
Heikkojen vuorovaikutusten määrä ja voimakkuus kasvaa näyteliuoksen konsentraation kasvaessa ja esimerkiksi rasvahappojen tapauksessa on todettu hiilispektrin karbonyylihiiltä kemiallisten siirtymien saavan suurempia arvoja, kun vetysidosten määrä kasvaa ja vuorovaikutusten merkitys korostuu.³⁷ Aromaattisilla yhdisteillä merkittäviä vuorovaikutuksia ovat delokalisoituneiden π -elektronien vuorovaikutus toistensa kanssa. Nämä vuorovaikutukset voivat ilmentyä muun muassa T-mallisissa vuorovaikutuksina (eng. face-to-edge) ja π -pinoutumisena. Näissä vuorovaikutus on samankaltaista, mutta molekyylien asema toisiinsa nähden on erilaista (Kuva 19). **Virhe. Viitteen lähde ei löytynyt.** Molemmissa tapauksissa vuorovaikutus voi olla joko intra- tai intermolekulaarista riippuen kohdemolekyylin koosta ja mahdollisista konformaatioista.



Kuva 19: Esimerkki aromaattisten yhdisteiden mahdollisista vuorovaikutuksista ja molekyylien asemoitumisesta kyseisissä tapauksissa esitettyä bentseenirenkaan avulla

π -Pinoutumisessa aromaattiset renkaat asettuvat toistensa lähelle, jolloin ne ottavat osaa toistensa ytimien varjostamiseen. Kuten yleensäkin varjostuksen kasvaessa, tämä tarkoittaa kemiallisen siirtymän arvon pienenemistä tavalliseen siirtymän arvoon verrattuna. Koska pinoutuminen riippuu näytteen lämpötilasta ja konsentraatiosta, voidaan sitä jossain määrin hallita pitämällä nämä muuttujat vakioina ja mahdollisuuksien mukaan konsentraatio pienenä.^{28,38,39} Jos näytteessä esiintyy π -pinoutumista, voivat molekyylit konsentraatiosta ja vuorovaikutusten määrästä riippuen olla sekä vapaina että osana komplekseja. Tällöin protoneille havaittu kemiallinen siirtymä on vapaiden ja kompleksoituneiden ydinten siirtymien keskiarvo.²⁸

Pinoutumisen vaikutus aromaattisten yhdisteiden dimeerien siirtymiin havaitaan esimerkiksi *o*-nitrobentsoehapon (2-nitrobentsoehappo, Kuva 20, **2**Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.) dimeerillä. Dimeerin muodostuessa ^{13}C -ydinten varjostuksen voisi olettaa pienenevän positiivisesti varautuneiden typpiatomien vetäessä elektroneja puoleensa, mutta tätä vastoin varjostus kasvaa pinoutumisen takia molekyylin kahdelle dimeeriselle muodolle hiilispektrin kokeelliset siirtymät ovat keskimäärin pienempiä kuin monomeerin vastaaville ytimille (Taulukko 1Virhe. Viitteen lähdettä ei löytynyt.).

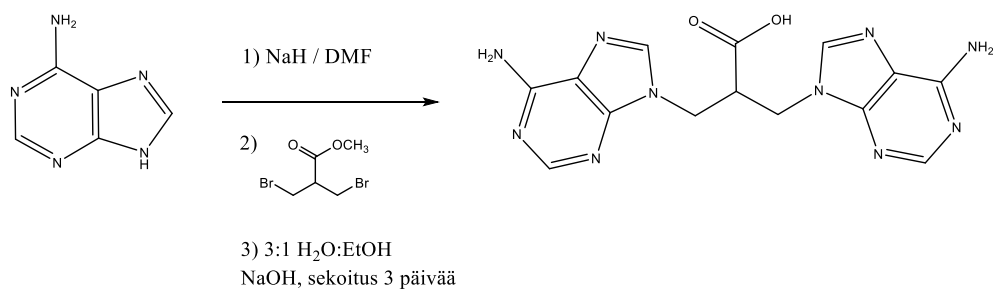


Kuva 20: 2-Nitrobentsoehapon (**2**) Z- ja E dimeerit (**3** ja **4** järjestyksessä)¹⁹

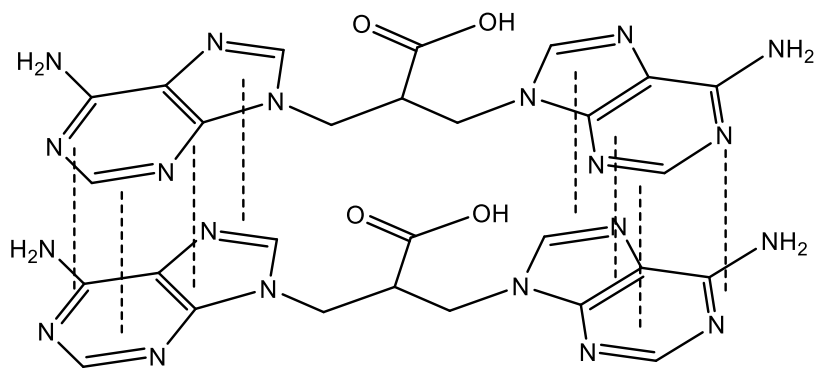
Taulukko 2: 2-nitrobentsoehapon monomeerin **2** ja dimeerien **3** ja **4** kokeelliset ^{13}C NMR siirtymät¹⁹

Ydin	Monomeerin siirtymä	Z-dimeerin siirtymä	E-dimeerin siirtymä
1	132.7	127.4	126.1
2	162.9	141.8	141.2
3	112.3	124.4	124.6
4	131.0	132.7	133.7
5	136.1	-	-
6	129.0	131.3	130.9

Myös esimerkiksi kahden adeniinin muodostaessa suurehkon karboksyylihappojohdannaisen (Kuva 21**Virhe. Viitteen lähde ei löytynyt.**) voidaan näytteen ollessa vesiliuoksessa protonispektrissä todeta siirtymien arvojen pienenevän jopa 0,27 ppm verran yksittäisten adeniinimolekyylien resonansseihin verrattuna.⁴⁰ Myös tällöin muutos selittyy molekyylin pinoutumisella (Kuva 22**Virhe. Viitteen lähde ei löytynyt.**).



Kuva 21: Adeniinien muodostama karboksyylihappojohdannainen (reaktio mukaillen artikkelia K. Kondo, M. Miyata ja T. Kiichi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1971, **44**, 2554–2555.⁴¹)



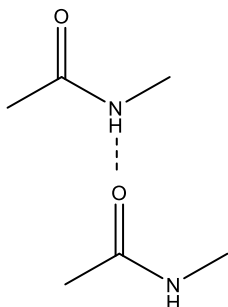
Kuva 22: Adeniinin karboksyylihappojohdannaisen π -pinoutuminen, jossa molekyylien välisiä vuorovaikutuksia on havainnollistettu katkoviivoin

Kaikilla aromaattisilla dimeereillä pinoutumista ei ole havaittavissa, sillä esimerkiksi erään monaftyylin johdannaisen ja sen dimeerin vesiliuoksen spektreissä erojen suuruus on pienempi kuin 0,014 ppm, kun taas naftyylin ja adeniinin muodostamassa rakenteessa siirtymien muutokset pienemmille arvoille ovat huomattavat verrattuna monomeerien vastaavien protonien siirtymiin.^{42,40}

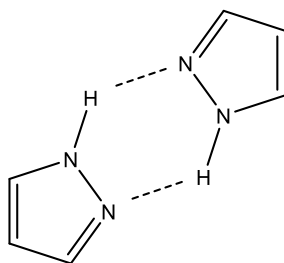
Protoneille vetysitoutumisen vaikutus ^1H NMR siirtymään on π -pinoutumiseen verrattuna päinvastainen ja protonispektrin siirtymät ovatkin suhteellisen herkkiä vetysidoksen vaikutuksille. Muutos voidaan nähdä resonanssin siirtymän muutoksena tai etenkin vaihtuvien protonien tapauksessa resonanssin levenemisenä vuorovaikutusten suhteellisen nopeuden vuoksi.⁴³

Vetysitoutumisen seurauksena protonin ytimen varjostus pienenee ja kemiallisen siirtymän arvo kasvaa, kun taas sidokseen osallistuvan typen, hapen tai fluorin elektronitiheys kasvaa niiden vetäessä elektroneja puoleensa.^{44,43} Näin käy muun muassa amideille ja pyratsolille liuoksen konsentroituessa, kun yksittäiset molekyylit muodostavat toistensa kanssa

vetysidoksen kautta aggregaatin (Kuva 23 ja Kuva 24)²¹. Tällöin konsentraation kasvaessa myös resonanssien arvot kasvavat tiettyyn pisteeseen asti, jossa kaikki liuoksen näytemolekyylit ovat muodostaneet vetysidokset toisiinsa, minkä jälkeen konsentraation nostaminen ei enää vaikuta siirtymiin.^{32,45}



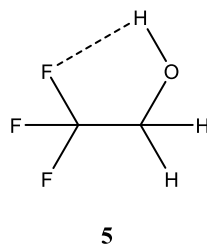
Kuva 23: N-metyyliasetamidin vetysidoksen kautta muodostama aggregaatti, jossa vetysidosta on havainnollistettu katkoviivalla



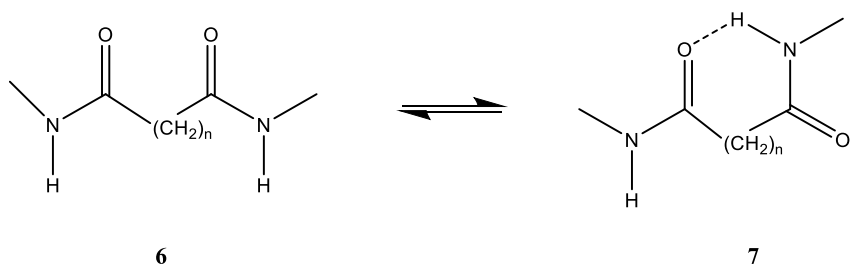
Kuva 24: 1,2-diatsolin (pyratsolin) vetysitoutumisen kautta muodostama aggregaatti

Jotkin yhdisteet kykenevät muodostamaan vetysidoksia itsensä kanssa, jolloin intra- ja intermolekulaariset vetysidokset kilpailevat keskenään. Näin voi tapahtua niinkin yksinkertaisille yhdisteille kuin trifluorietanoli (TFE, Kuva 25)⁴⁴ ja esimerkiksi joidenkin diamidien tapauksessa

intramolekulaariset vetysidokset muodostavat syklisiä rakenteita (Kuva 26), jotka kilpailevat avoketjuisen muodon kanssa.³²



Kuva 25: Trifluorietanolin intramolekulaarinen vetysidos⁴⁴



Kuva 26: Diamidien muodostama syklinen rakenne intramolekulaarisen vetysitoutumisen seurauksena, kun $n = 1, 2, 3$ tai 4 . Avonaisella ketjulla on kolme rotameeria, joissa tyypeen sitoutuneet protonit voivat olla joko anti- tai syn-puolella karbonyylihapteen nähden. Rengasrakenteelle rotameereja on kaksi vapaana olevalle HNMe-protonille. Molemmissa tapauksissa anti-konformaatio on suositumpi ⁴⁵

Jos intramolekulaarisen vetysitoutumisen muodostaa tällaisia syklisiä rakenteita, jolloin avonainen ja rengasrakenne ovat näytteessä tasapainossa, havaittu siirtymä voidaan laskea liuoksessa olevien spesiesten konsentraatioiden avulla Yhtälöllä (16).⁴⁵ Samalla vetysitoutuneen rengasrakenteen ja avoketjuisen rakenteen

vetysitoutumiseen liittyvää tasapainovakiota K_{eq} voidaan kuvata siirtymien avulla (Yhtälö (17)).³²

$$(16) \quad \delta_{obs} = X_N \delta_N + X_B \delta_B$$

Yhtälössä (16) X_N on avoketjuisen ja X_B rengasrakenteen mooliosuus näytteessä ja δ_N ja δ_B ovat niitä vastaavat siirtymät.

$$(17) \quad K_{eq} = (\delta_{obs} - \delta_N) / (\delta_B - \delta_{obs})$$

Havaittava siirtymä lasketaan siis intramolekulaarisen vetysitoutumisen tapauksessa avoketjuisen ja rengasrakenteisen muodon siirtymien avulla, mutta huomattavaa on, että tällöin näytemolekyylin konsentraatio liuoksessa ei vaikuta vaihtuvan protonin siirtymään, toisin kuin intermolekulaarisen vetysitoutumisen tapauksessa.⁴³ Tämä johtuu siitä, että intramolekulaarisen vetysidoksen syntyyn ja määrään ei vaikuta näytteen konsentraatio.

Jos vetysitoutuminen tapahtuu kahden tai useamman erillisen molekyylin välillä, on niiden konsentraatio liuoksessa luonnollisestikin rajoittava tekijä sidosten synnyn kannalta, mutta konsentraation lisäksi myös lämpötila on huomattava tekijä vetysitoutumista tarkasteltaessa. Lisäksi sidosten muodostumiseen vaikuttavat liuotin, ionivahvuus ja pH, mutta erityisesti spesiesten konsentraation vuoksi vetysidosten vaikutusta siirtymiin voidaan tutkia sekä konsentraation että lämpötilan muutoksen avulla.³²

Vetysidoksen vahvuudesta riippuu, kuinka paljon kemiallinen siirtymä muuttuu esimerkiksi lämpötilan muuttuessa. *Ab initio* laskujen mukaan N-H -- O sidoksen muodostuessa vetysidos on vahvimmillaan lähes lineaarisena (noin 160°), kun taas C=O -- H sidoksen tapauksessa sidoksen vahvuus ei ole kulmasta yhtä herkkä, kunhan se on 90° :tta suurempi.³²

Kaiken kaikkiaan heikkojen vuorovaikutusten merkitys sitoutuu useisiin muihin tekijöihin, sillä useiden parametrien, kuten lämpötilan, konsentraation ja liuottimen, vaikutus perustuu suurilta osin muutoksiin vuorovaikutusten määrässä. Osittain tämän vuoksi, mutta myös vuorovaikutusten havainnollistamisen ja mittaamisen vaikeuden vuoksi, on olemassa harvoja tutkimuksia, jotka olisivat keskittyneet yksinomaan vuorovaikutusten määrään. Jonkin verran tutkimusta löytyy puhtaasti π -pinoutumiseen liittyen, mutta esimerkiksi vetysitoutumisen merkitys kemiallista siirtymää tarkasteltaessa jää usein kuvailtavaksi muihin parametreihin liittyvänä suureena. Keskimäärin vuorovaikutusten merkitys onkin tärkeää muistaa muita siirtymään vaikuttavia tekijöitä tarkasteltaessa, sillä ne helpottavat muiden riippuvuuksien ymmärtämistä ja ennustamista.

3.2.4. Konsentraatio, pH ja ionivahvuus

Parametreinä konsentraatio ja pH ovat helposti näytteen valmistusvaiheessa huomioon otettavissa tai muuten helposti mitattavissa olevia tekijöitä, minkä vuoksi niihin liittyvää tutkimusta on tehty jo varsin varhaisessa vaiheessa.⁴⁶ Niiden merkitys kemiallista siirtymää tarkasteltaessa ei kuitenkaan ole täysin suoraviivaista ja ne ovat tietyllä tasolla kytköksissä toisiinsa, sillä konsentraation muutoksen myötä liuoksen pH usein muuttuu jossain määrin. Näin käy erityisesti silloin, kun tutkittavalla yhdisteellä on jonkintasoista taipumusta luovuttaa tai vastaanottaa protoni, eli toimia Brønsted-Lowryn happona tai emäksenä. Esimerkiksi hapoilla korkeampi näyteaineen konsentraatio johtaa suurempaan protonikonsentraatioon ja tätä myöden alempaan pH:seen. Yleisesti sekä konsentraation kasvaminen että pH:n lasku johtaakin vetysitoutumisen voimistumiseen yhdisteillä, jotka saavat ionisoituessaan negatiivisen varauksen, eli jotka toimivat happoina. Konsentraation vaikutuksen monimutkaisuus havaitaan myös siinä, että vetysitoutumiseen vaikuttamisen lisäksi konsentraation kasvu saattaa johtaa dimerisoitumisen tai polymerisoitumisen lisääntymiseen.

Konsentraation kytkös vuorovaikutuksiin havainnollistuu jossain määrin ligandeja, eli molekyylin metalliatomiin koordinaatiosidosten avulla sitoutuvia ylimääräisiä rakenneosia, käytettäessä, sillä vaikka myös poikkeuksia löytyy esimerkiksi proteiinien tapauksissa, niin yleisesti ottaen kompleksien muodostuttua ytimen vuorovaikutus ympäristön kanssa vähenee, eikä konsentraatio enää juurikaan vaikuta siirtymiin.³⁶ Lisäksi etenkin hyvin konsentroituihin näytteisiin siirryttäessä on myös esitetty, että spektrin muutokset voisivat liittyä ainakin jossain määrin näytteen viskositeetin muutokseen.⁴⁷ Koska konsentraation ja pH:n vaikutus on selvästi havaittavissa kemiallisten siirtymien muutoksina, on käytännön

työskentelyssä esimerkiksi sisäistä standardia käytettäessä konsentraation vaikutus syytä ottaa huomioon, jotta muun muassa epätoivottuja piikkien päällekkäisyyksiä ei aiheutuisi.⁴⁶

Jotta pH:n merkitystä kemialliseen siirtymään voitaisiin tarkastella näytteen liuottimesta riippumatta, on pH määriteltävä tietyllä tavalla. Konsentraatiosta riippuvana suurena esitettynä pH:ta voidaan kuvata molaarisuusasteikolla (mol/dm^3) pH_c :nä (Yhtälö (18)) ja vastaavasti molaalisuuden (mol/kg^3) mukaan pH_m :na (Yhtälö (19)).

$$(18) \quad \text{pH}_c = -\log\left(\frac{c_H \gamma_{c,H}}{c^0}\right)$$

$$(19) \quad \text{pH}_m = -\log\left(\frac{m_H \gamma_{m,H}}{m^0}\right)$$

Yhtälöissä (18) ja (19) m^0 ja c^0 ovat standarditiloja 1 mol/kg^3 ja 1 mol/dm^3 kuvaavia vakioita ja $\gamma_{v,H}$ ja $\gamma_{m,H}$ ovat aktiivisuutta kuvaavia vakioita molaarisuus ja molaalisuusasteikolla. Laimeissa liuoksissa molaarisuus ja molaalisuus ovat kytköksissä toisiinsa Yhtälön (20) kautta, jolloin ρ on liuoksen tiheys ja ρ^0 on 1 kg/dm^3 :

$$(20) \quad \text{pH}_c = \text{pH}_m + \log(\rho/\rho^0)$$

Vesiliuoksissa tiheys ρ on huoneenlämmön vaihteluvälillä yleensä hyvin lähellä ρ^0 :n arvoa, jolloin molaarisuus- ja molaalisuusasteikolla esitettyjen pH:iden arvot eivät juurikaan eroa toisistaan. Käytännön työskentelyssä molaarisuusasteikon käyttäminen on suositumpaa näytteiden valmistamisen ja laskujen yksinkertaisuuden vuoksi. Tästä huolimatta IUPAC suosii molaalisuusasteikkoa, jonka arvot eivät ole riippuvaisia lämpötilasta, toisin kuin molaarisuus, joka on kytköksissä tiheyteen.⁴⁸

Vaikka pH siis voidaan mitata muissa liuottimissa, niin vain vedessä asteikko on niin sanotusti absoluuttinen, koska perinteisen määritelmän mukaan pH lasketaan liuoksen protonikonsentraation, eli vesiliuoksessa oksoniumionien H_3O^+ , mukaan (Yhtälö (21)). Lisäksi asteikon absoluuttisuus ainoastaan vedessä johtuu pH:n aktiivisuusriippuvuudesta, johon mittaustuloksia verrataan. Huomioon tulee kuitenkin ottaa myös se, että vedenkin aktiivisuuteen vaikuttavat muun muassa kaikki liuokseen liuenneet yhdisteet, kuten suolat ja epäpuhtaudet.

$$(21) \quad pH = -\log[H_3O^+]$$

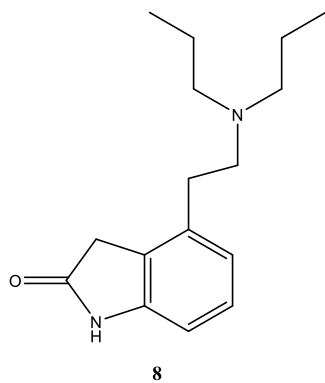
Muussa liuottimessa kuin vedessä aktiivisuuden vertailukohdaksi voidaan valita vesi- tai mittaustiiliuotinliuos, jolloin asteikot eroavat toisistaan. Tätä ongelmaa korjaamaan on kehitetty merkintä, jossa pH:lle annetaan vasemmanpuoleiset ylä- ja alaindeksit, joista yläindeksi kertoo näyteliuoksen liuottimen ja alaindeksi vastaavasti vertailukohtana käytetyn liuottimen, eli liuottimen, jossa elektrodin kalibrointi on suoritettu. Esimerkiksi ${}_w^pH$ tarkoittaa, että sekä kalibrointi että mittaus on suoritettu vesiliuoksessa, kun taas ${}_s^pH$ asteikolla kalibrointi on suoritettu vesiliuoksilla, mutta mittaukset suoritetaan liuottimessa s . Tällöin näyteliuottimessa kalibroidun ja vedessä kalibroidun pH-asteikon suhde voidaan esittää Yhtälöllä (22): ⁴⁸

$$(22) \quad {}_s^pH = {}_w^pH - \log({}_w^s\gamma_H^0)$$

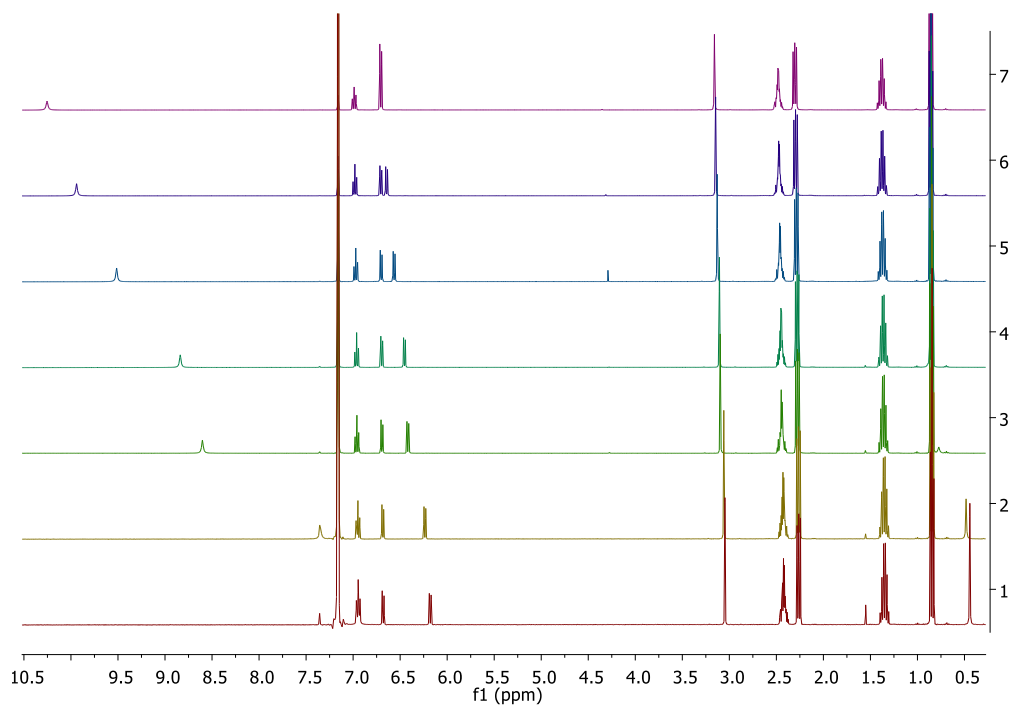
Yhtälössä (22) aktiivisuuskertoimen lähestyy yhtä, kun liuoksen sekoitussuhde (esimerkiksi orgaaninen liuotin:vesi) lähestyy 100% vettä.⁴⁸ Tällä pH:n määritelmällä kyetään siis tarkastelemaan pH:ta myös vedestä poikkeavissa liuottimissa, sekä olosuhteissa, joissa on käytetty veden ja jonkin muun liuottimen liuosta eri suhteissa.

Sekä konsentraation että pH:n merkitys on voimakkaimmin nähtävissä protonispektreissä, joissa etenkin aromaattisten protonien siirtymille on tyypillistä havaita muutoksia. Muutoksen suuruus on molekyylin kuhunkin resonanssiin erikseen liittyvä, eikä sen suuruutta voida ennustaa muiden yhdisteen ytimien muutoksen perusteella, vaan laskuihin tarvitaan muun muassa tieto tutkittavan ytimen siirtymien ääripäistä yhdisteen ollessa täysin protonoitunut ja deprotonoitunut.⁴⁹

Luonnollisestikin konsentraation vaikutus on erityisesti havaittavissa vaihtuvien protonien siirtymille, mutta myös vaihtumattomien protonien siirtymien on todettu muuttuvan konsentraation myötä²⁷ ja vaihtelun olevan tyypillisesti suurempaa aromaattisten kuin alifaattisten protonien tapauksissa.^{50,47} Esimerkiksi ropinirolin (Kuva 27) tapauksessa tämä on havaittavissa, kun liuottimena käytetään bentseeniä (Kuva 28), jolloin muutos johtuu π -pinoutumisesta. Konsentraation vaikutusta ei tällöinkään nähdä aina, sillä samalle yhdisteelle siirtymissä ei juurikaan ole havaittavaa muutosta millään protonispektrin alueella, kun liuottimena on DMSO.⁴⁷



Kuva 27: Ropinirolin rakenne⁴⁷



Kuva 28: Ropinirolin protonispektrin muutos bentseeni-d₆:ssa eri konsentraatioissa. Pystyakselilla spektrien numerointi vastaa seuraavia konsentraatioita: 7 = 160 mg/ml, 6 = 80 mg/ml, 5 = 40 mg/ml, 4 = 20 mg/ml, 3 = 10 mg/ml, 2 = 4 mg/ml, 1 = 2 mg/ml (Kuva: M. Jörg, S. Headey, P. J. Scammells ja B. Capuano, *Magn. Reson. Chem.*, 2014, **52**, 715–718.)

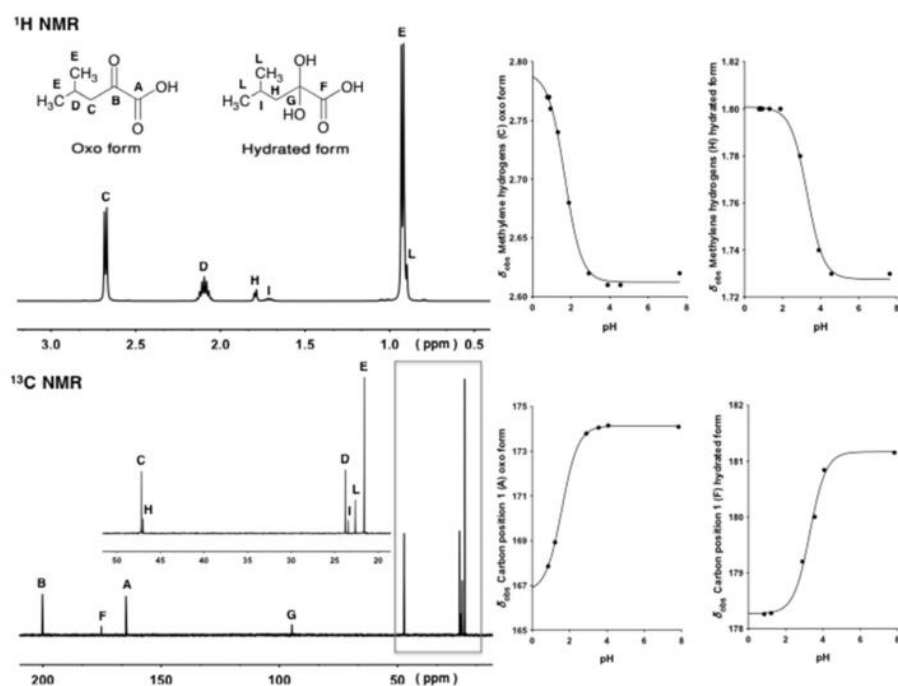
Hiilispektrissä pH:n vaikutus ei tavallisesti ole samalla tasolla havaittavissa kuin protonispektrissä, mutta tähän poikkeuksen tekee karbonyylihiilen siirtymä, joka riippuu vahvasti karbonyylin hapen protonoitumisasteesta,⁵¹ sekä ryhmän mahdollisesta pelkistymisestä (Kuva 29).⁵² Yhdisteillä, joilla on taipumusta π -pinoutumiseen, konsentraation nostaminen johtaa siirtymien pienenemiseen, kun vuorovaikutusten määrä kasvaa konsentraation kasvun myötä.²⁷ Näin on todettu tapahtuvan esimerkiksi folaattien ja foolihappojen tapauksessa, jossa liuoksen laimentaminen johti siirtymien suurenemiseen.⁵³

Yleisesti ottaen konsentraation vaikutuksen suuruus on usein suurempi protoni- kuin hiilispektrissä, mutta poikkeuksiakin löytyy yksittäisistä rakenteista sekä yhdisteryhmistä. Esimerkiksi erilaisten puriiniemästen tapauksessa hiilispektrin siirtymien muutos on suurempi protonien siirtymien muutoksiin verrattuna. Puriinin tapauksessa havaittu siirtymä voidaan laskea pinoutumiseen osaa ottavien molekyylien lukumäärän mukaan painotetun summana (Yhtälö (23)). Tällöin protonien siirtymien laskennalliset arvot ovat kuitenkin systemaattisesti keksimäärin 0,2 ppm pienempiä kuin kokeelliset arvot.²⁷

$$(23) \quad \delta_{obs} = \delta_1\chi_1 + \delta_2\chi_2 + \delta_3(1 - \chi_1 - \chi_2) = \delta_1\chi_1 + \delta_2\chi_2 + \delta_3\chi_3$$

Yhtälössä (23) δ_1 on monomeerin, eli vapaana olevan puriiniemäksen, siirtymä, δ_2 kahden pinoutuneen ja δ_3 kolmen pinoutuneen molekyylin siirtymä ja χ_n kutakin siirtymää vastaavan yhdisteen mooliosuus.

Konsentraation ja siirtymän muutoksen suhde ei ole aina lineaarinen. Se riippuu yhdisteen kasautumistaipumuksesta ja siitä, muodostaako tutkittu molekyyli suurempia kokonaisuuksia kuin kahden monomeerin yhdistelmiä tai esimerkiksi erilaisia hydraatteja. Sama vaikutus on havaittavissa, jos konsentraation muutos johtaa pH:n muutokseen, kuten esimerkiksi happojen ja emästen tutkimuksessa herkästi tapahtuu.⁵³



Kuva 29: Ketoleusiinin ¹H- (pH=1,8) ja ¹³C NMR (pH=0,8) spektrit, sekä C- ja H-protonien ja A- ja F-hiiliydintien kemiallisten siirtymien muutos pH:n funktiona (kuva: A. Lopalco, J. Douglas, N. Denora ja V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.*, 2016, **105**, 664–672.)

Kuten vuorovaikutuksiin liittyvässä kappaleessa 3.2.3. mainittiin, voidaan joissain tapauksissa sanoa molekyylillä olevan taipumus kasautua (eng. cluster) liuoksessa. Tätä termiä käytetään, kun näyttemolekyyleillä on kyky ja taipumus muodostaa vetysidoksia tai vuorovaikuttaa toistensa kanssa esimerkiksi π -pinoutumisen kautta, tai jos sen poolisuus johtaa

dipoli-vuorovaikutuksiin. Yhdisteille, joilla tätä taipumusta ei ole, spektrissä ei teorian mukaan pitäisi olla havaittavissa muuta kuin intensiteetin muutos konsentraation muutoksen seurauksena. Kasautuville molekyyleille näytekonsentraation kasvaessa spektrin piikkejä saattaa esiintyä enemmän tai viivanmuoto levitä laimeampiin näytteisiin verrattuna.³¹ Yleisesti ajatellaankin alifaattisten ja aromaattisten ydinten protonisiirtymien konsentraatioriippuvuuden johtuvan molekyylien kasautumisesta tavalla tai toisella, vaikka asiaa on tutkittu suhteellisen vähän verrattuna vaihtuvien protonien konsentraatioriippuvuuteen.⁴⁷

Ropiniroli on hyvä esimerkki liuottimen vaikutuksesta siirtymien muutosten suuruuteen ja tutkitun yhdisteen siirtymien konsentraatioriippuvuus vaihtelee usein eri liuottimien välillä.^{47,54} Aromaattisten protonien siirtymien muutosten tapauksissa usein oletetaan muutokseen liittyvän ainakin osittain konsentraation myötä kasvavasta π -pinoutumisesta,⁵⁴ vaikka myös toisin on todettu olevan esimerkiksi kvinoliinin johdannaisten tapauksissa, jolloin siirtymiin vaikuttavat tekijät ovat todennäköisesti olleet muut kuin näytemolekyylien keskinäiset vuorovaikutukset, kuten esimerkiksi liuotin- ja näytemolekyylien väliset vuorovaikutukset.⁵⁵

Vaihtuvat protonit ovat muita yhdisteen protoneja herkempiä liuottimen, konsentraation ja pH:n vaikutukselle. Hydroksyylin protonin kemiallisen siirtymän on todettu siirtyvän korkeampaan kenttään asetoni- ja DMSO-liuoksissa, kun näytteen konsentraatio pienenee. Muissa yhteyksissä on todettu sama vaihtuvan protonin kemiallisen siirtymän arvon kasvaessa konsentraation noston myötä, kun vetysitoutuminen näytteessä lisääntyy.⁵⁰

Fenolille kemiallisen siirtymän muutos on lineaarisesti riippuvainen näytteen konsentraatiosta deuterokloroformissa, mutta silloinkin toisiaan vastaavien siirtymien ero konsentraation 10 mg/ml ja ”äärettömän laimennoksen” (eng. infinite dilution) välillä on vain 0,1 ppm.⁵⁶

Koska funktionaalisen ryhmän deprotonoituminen ja protonoituminen muuttavat tapaa, jolla ryhmä varjostaa lähellä olevia ytimiä, on pH:n merkitys kemiallista siirtymää laskettaessa tai tarkasteltaessa otettava huomioon erityisesti yhdisteille, joiden funktionaalisilla ryhmillä on taipumus luovuttaa tai vastaanottaa protoni. Keskimäärin voidaan sanoa, että molekyylin protonoituvaa kohtaa lähellä olevien protonien kemiallisen siirtymän riippuvuus pH:sta on suurempi kuin protoneilla, jotka sijaitsevat kauempana protonoitumiskohdasta ja esimerkiksi karboksyylihappojen tapauksessa α -protonien siirtymien arvot muuttuvat enemmän kuin β -protonien pH:n muuttuessa.⁵⁷

Siirtymän ja pH:n välistä riippuvuutta voidaan tutkia käytännön kokeilla, joissa näyteliuoksen pH:ta säädetään ja spektri mitataan eri pisteissä. Tällaiset tutkimukset ovat osoittaneet, että riippuvuus ei tyypillisesti ole lineaarista.⁵³ Sen sijaan riippuvuus vastaa odotettavasti käyrää, joka mukailee pH:n seuraamaa Henderson-Hasselbalch -yhtälöä (Yhtälö (24), Kuva 30 ja Kuva 31). Tätä mukautettua yhtälöä voidaan käyttää kaikenlaisten monoproottisten happojen siirtymien laskemiseen ja tarkasteluun^{58,59,60} ja se soveltuu myös esimerkiksi J-kytkentöjen pH-riippuvuuden tutkimiseen (Yhtälö (26)),⁶¹ mutta usein kytkentöjen muutokset ovat sen verran pieniä, että mittauksen tarkkuus ei ole riittävä riippuvuuden havainnointiin kokeellisen datan perusteella.

$$(24) \quad \delta_{obs} = \frac{\delta_A + (\delta_{HA} * 10^{(pH-pK_a)})}{10^{(pH-pK_a)} + 1}$$

Yhtälö (23) voidaan myös esittää muodossa:

$$(25) \quad pK_a = pH + \log \frac{\delta_A - \delta_{obs}}{\delta_{obs} - \delta_{HA}}$$

Ja J-kytkentöjen tarkasteluun sitä voidaan käyttää samalla tavoin, jolloin J_{obs} on havaittu, J_A on deprotonoituneen ja J_{HA} protonoituneen muodon kytkentä:

$$(26) \quad pK_a = pH + \log \frac{J_A - J_{obs}}{J_{obs} - J_{HA}}$$

Yllä esitetyt yhtälöt pätevät muodossaan vain hapoille, mutta ne voidaan myös muuntaa emäksille sovellettaviksi versioiksi ottamalla huomioon emäs- ja happovakioiden pK_b ja pK_a suhde $pK_a + pK_b = 14$ sekä pH-asteikon muutos pOH-asteikolle suhteella $pH + pOH = 14$. Nämä yhdessä logaritmien laskusääntöjen kanssa johtavat seuraavaan muotoon:

$$(27) \quad \delta_{obs} = \frac{\delta_B + (\delta_{BH} * 10^{(pK_b - pOH)})}{10^{(pK_b - pOH)} + 1}$$

Jos tutkittava yhdiste on diproottinen happo, on laskuissa käytettävä Yhtälön (27) laajempaa muotoa (Yhtälö (28)).^{58,59,60} Yhtälöön pitääkin lisätä termejä sen mukaan, kuinka monta protonoituvaa kohtaa sillä on (Yhtälö (29)).⁶² Diproottista yhtälöä täytyy käyttää totuudenmukaisen ratkaisun saavuttamiseksi myös tapauksissa, joissa yhdiste sisältää lisäksi esimerkiksi aminoryhmän.⁵⁸

Yleisesti, riippumatta yhdisteen proottisuudesta, siirtymän pH-riippuvuus on havaittavissa myös visuaalisesti, kun siirtymä esitetään pH:n funktiona, jolloin muodostunut käyrä muistuttaa muodoltaan titrauskäyrää.

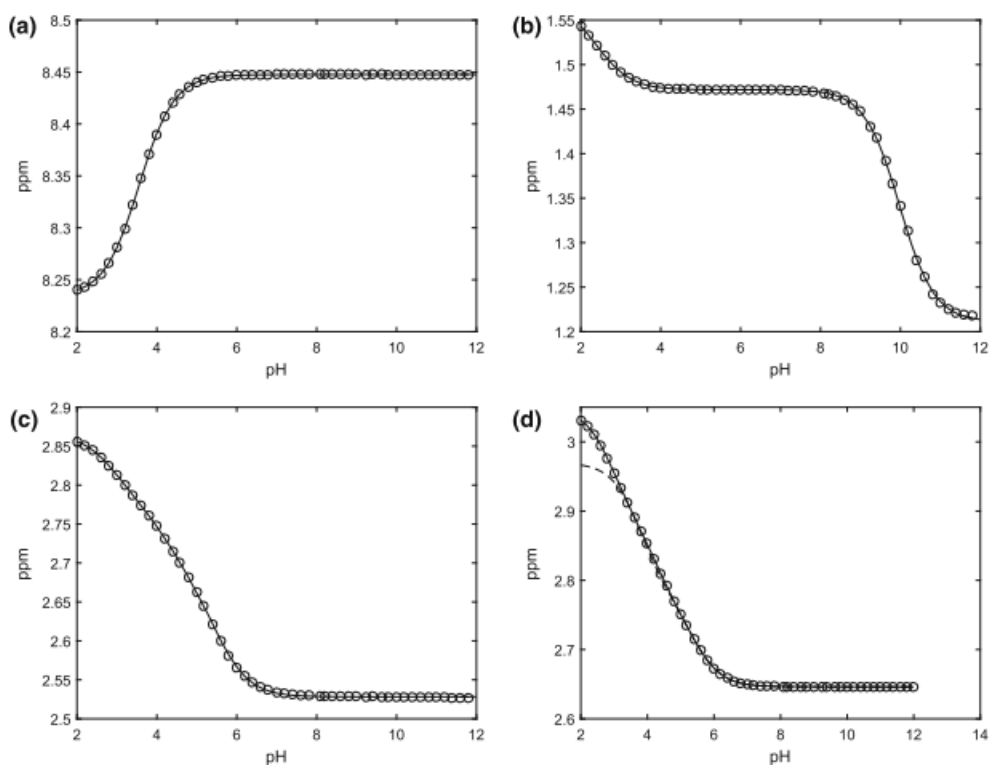
$$(28) \quad \delta_{obs} = \frac{\delta_{H_2A}}{1+10^{(pH-pK_{a1})}+10^{(2pH-pK_{a1}-pK_{a2})}} + \frac{\delta_{HA}}{1+10^{(pK_{a1}-pH)}+10^{(pH-pK_{a2})}} + \frac{\delta_A}{1+10^{(pK_{a2}-pH)}+10^{(pK_{a1}+pK_{a2}-2pH)}}$$

$$(29) \quad \delta_{obs} = \left[\delta_A + \sum_{i=1}^n \delta_{HiA} 10^{(\sum_{j=n-i+1}^n pK_j) - ipH} \right] / \left[1 + \sum_{k=1}^n 10^{(\sum_{l=n-k+1}^n pK_l) - kpH} \right]$$

Etenkin proteiinien tutkimuksen yhteydessä on tehty pH-riippuvuuden tutkimusta ja esimerkiksi erilaisten polypeptidien ja yksittäisten aminohappojen siirtymien muutosta pH:n funktiona on mitattu. Muutosten suuruus ja riippuvuus vaihtelevat aminohapoista toiseen ja tuloksia on taulukoitu jonkin verran. Tuloksia voidaan myös tietyllä tasolla ennustaa laskennallisilla menetelmin erilaisten ohjelmien algoritmien avulla, ⁵⁹ sillä muutokset perustuvat ainakin osittain vetysidosten määrälle. Histidiinin ja tyrosiinin tapauksessa protonien kemiallisten siirtymien pH-riippuvuuden on todettu riippuvan protonoidun ja protonoimattoman muodon konsentraatioita Yhtälön (30) mukaan, ⁶³ jolloin BH vastaa protonoitunutta ja B protonoimatonta aminohapon muotoa:

$$(30) \quad \delta_{obs} = \frac{\delta_{BH}[BH] + \delta_B[B]}{[BH] + [B]}$$

Aina pH-titrauksen tulokset eivät istu täydellisesti esitettyihin yhtälöihin, mutta tällöin voi olla kyse monoproottisen hapon yhtälön soveltamisesta diproottista happoa tutkittaessa tai käytännön ongelmista titraukseen liittyen. Esimerkiksi foolihappojen ja folaattien tutkimuksessa sakkautumisen aiheuttaman virheen on todettu vaikeuttanut datan istuttamista titrauskäyrään.⁵³ Lisäksi joissain tapauksissa, kuten sitraatin metyleenien AB-spinsysteemien kohdalla, saman systeemin eri protonien kemiallisten siirtymien muutokset istuvat toisistaan eroaviin yhtälöihin ilman ilmeistä syytä. Sitraatin metyleeniprotoneille tämä on nähtävissä Kuvassa 29 kohdissa c ja d, joissa avoimet pallot ovat protonien siirtymät ja viivat sovituksia. Kuvan kohdassa c nähdään ensimmäisen protonin siirtymien istuvan triproottisen hapon käyrään, kun taas d:ssä sama käyrä on esitetty katkoviivalla ja kokeelliset siirtymät asettuvat tetraproottiselle käyrälle paremmin.⁶⁴



Kuva 30: Formaatin CH:n (a), alaniinin CH₃:n (b) ja sitraatin CH₂ (c ja d) protonien kemiallisten siirtymien muutos pH:n funktiona virtsanäytteissä. Mitatut siirtymät on esitetty avoimina palloina ja sovitukset viivoina. Sovitukset järjestyksessä a, b ja c ovat mono-, di- ja triproottisen hapon käyrille. Kuvassa d triproottisen sovituksen käyrä on esitetty katko- ja tetraproottinen yhtenäisellä viivalla. (Kuva: G. D. Tredwell, J. G. Bundy, M. De Iorio ja T. M. D. Ebbels, *Metabolomics*, 2016, **12**, 1–10.)

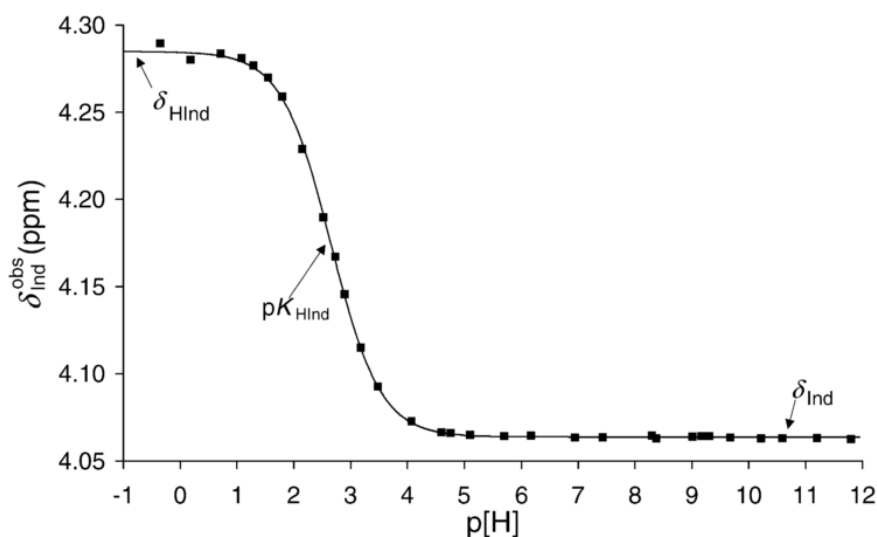
Jos pH:n tiedetään vaikuttavan huomattavasti tutkittuihin siirtymiin, voidaan muutosta ehkäistä puskuroimalla näyte.⁶ Tätä harjoitetaan jonkin verran varsinkin biologisia näytteitä käsiteltäessä, jolloin liuos puskuroidaan noin pH = 7:ään. Esimerkiksi virtsanäytteiden tapauksessa puskurointi on yleistä, sillä sopiva puskuri pitää pH:n tasaisena ja sen lisäksi ehkäisee ionivahvuuksista johtuvia kemiallisen siirtymän muutoksia. Ionivahvuuden ja pH:n vaikutus virtsanäytteiden protonispektreihin voidaan nähdä kuvissa 18 ja 19. Puskurointi voi

toisinaan olla haastavaa, sillä puskuria pitää olla riittävästi hyötyjen saavuttamiseksi, mutta liiallinen määrä sitä johtaa etenkin protonispektrin laadun heikkenemiseen.⁶⁵

Toinen vaihtoehto on säätää pH automaattisella titrauksella pienemmäksi kuin tutkittujen yhdisteiden pK_a :t, jolloin rakenteiden voidaan olettaa olevan täydellisesti protonoituneita. Molemmat tekniikat ovat suurelle yhdistejoukolle toimivia ja käytännöllisiä toimintatapoja, mutta eivät silti ole aina toimiva ratkaisu, sillä esimerkiksi histidiinin tapauksessa siirtymien herkkyys pH:lle on huomattavan suuri (0,08 ppm/pH-yksikkö) ja muutokset siirtymissä ovat nähtävissä puskuroinnin jälkeenikin.^{57,64} Lisäksi näytteen säätäminen happamaksi on huono vaihtoehto, jos tutkimus keskittyy muihin pH-herkkiin yhdisteisiin, kuten nukleotideihin.⁶⁴

Siirtymien arvojen muutoksen pH:n mukaan ei tarvitse olla ongelma, vaan sitä voidaan myös käyttää hyväksi, sillä resonanssien siirtymiä voidaan käyttää näytteen pH-indikaattorina. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää joko erityistä pH-indikaattorimolekyyliä tai jopa tutkittavan aineen omia resonansseja, jos yhdisteen resonanssien käyttäytyminen laajalla pH-alueella tunnetaan.^{57,60,66} Oikein käytettyinä indikaattorien on todettu lisäävän liuoksen pH:n arvioinnin tarkkuutta pelkän lasielektrodin käyttöön verrattuna.⁶² Jotta indikaattoria olisi järkevää ja luotettavaa käyttää, on sen pH-herkkien resonanssien muutosten suuruus oltava tarkasti tunnettu ja niiden tulee sijaita alueella, jolla ne eivät häiritse tutkitun yhdisteen spektrin tulkintaa. Tyypillisesti tämä tarkoittaa analyytin resonansseista riippuen hyvin korkeaa tai matalaa ppm-arvoa.

Lisäksi indikaattorin on syytä olla halpa ja helposti saatavilla, sekä inertti ja stabiili, jotta epätoivottuja sivureaktioita ei pääse tapahtumaan. Sen resonansseihin eivät myöskään saisi vaikuttaa muut tekijät kuin pH, jotta indikaattorin luotettavuus säilyisi. Tämä tarkoittaa, että esimerkiksi liuoksen ionivahvuus tai muut liuottimen ja analyytin väliset vuorovaikutukset eivät saisi olla nähtävissä siirtymien arvoissa. Jos indikaattoria halutaan käyttää esimerkiksi biologisten näytteiden analysoinnin yhteydessä, on tärkeää, että se on vesiliukoinen, mutta että sen resonanssit eivät jää spektrissä vesipiikin alle, jotta niitä voidaan lukea spektristä. Vaatimusten kirjo on siis ymmärrettävästi suhteellisen laaja, mutta siitä huolimatta lukuisia indikaattoreita on kaupallisesti tarjolla ja niitä on onnistuneesti käytetty ainakin ^1H , ^{31}P , ^{19}F ja ^{13}C NMR kokeiden yhteydessä.^{62,66} Joitain käytettyjä indikaattoreita ovat esimerkiksi etikkahappo, kloorietikkahappo, dikloorietikkahappo ja fosforihappo, joista kloorietikkahapon titrauskäyrä on esitetty Kuvassa 31.⁶²



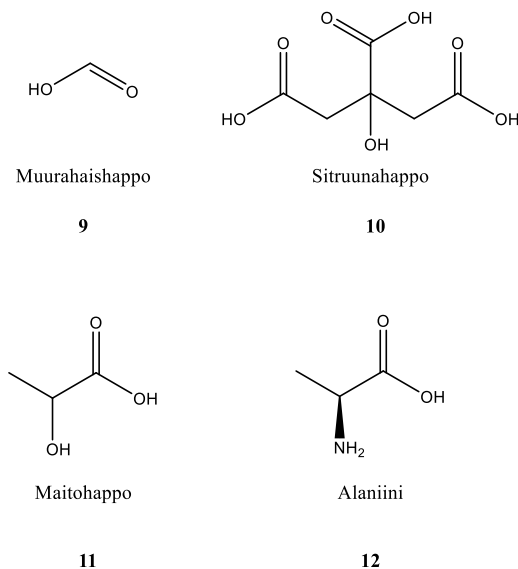
Kuva 31: Kloorietikkahapon ^1H NMR spektrin CH_2 -protonien siirtymät 1:9- $\text{D}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O}$ liuoksessa sovitettuna monoproottisen hapon Henderson-Hasselbalch-käyrään (kuva: Z. Szakács, G. Hägele ja R. Tyka, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **522**, 247–258.)

Ionivahvuus ja tiettyjen maa-alkalimetallien ionien, kuten Mg^{2+} ja Ca^{2+} , konsentraatio saattavat myös vaikuttaa kemiallisiin siirtymiin,⁵⁷ etenkin niiden konsentraatioiden noustessa huomattavan korkeaksi, sillä tällöin ionien ja näytemolekyylin välisten vuorovaikutusten määrä kasvaa. Lisäksi suuri suolakonsentraatio vähentää NMR-laitteiston herkkyyttä.⁶⁴ Ionivahvuuden vaikutus perustuu teoreettisesti sille, että ionit vaikuttavat yhdisteiden ionisoitumisen tasapainovakioihin, mutta esimerkiksi erilaisten ihmisen virtsassa esiintyvien metaboliittien tapauksessa vaikutus perustuu lähinnä tutkittavan yhdisteen ja ionin kompleksinmuodostukselle.⁶⁷ Koska kompleksinmuodostus on tyypillisesti havaittavissa erityisesti hiilispektrin siirtymien suurinakin muutoksina, voidaan tätä hyödyntää esimerkiksi mahdollisten metallikontaminaatioiden havaitsemiseen.⁴⁷

Jos inertin suolan konsentraatio näyte- tai indikaattorimolekyylin konsentraatioon nähden on 40-50-kertainen, on vaikutus nähtävissä myös kohdeyhdisteen pH-riippuvuudessa, sillä silloin δ_A :n ja δ_{HA} :n arvot muuttuvat ja δ_{HA} :n muutos on suurempi.⁶⁰ Liuoksen ionivahvuuden vaikutus siirtymään perustuu siihen, että se muuttaa kohdeyhdisteen pK_a :ta. Riippuvuutta voidaan kuvata siirtymän muutoksena ionivahvuusyksikköä kohden ja esimerkiksi metyylifosfonaatin ^{31}P NMR-spektrin piikin arvon muutokselle on kokeellisesti todettu erilaisia arvoja, kuten -0,994 ppm / 100 ja -0,829 ppm/ ionivahvuusyksikkö.⁶⁸

Yksittäisten ionien konsentraation merkitys riippuu kohdemolekyylistä sekä kyseessä olevasta ionista. Esimerkiksi sitruunahapon (Kuva 32, **10**) suolalle, sitraatille, pätee, että Mg^{2+} -ionin konsentraation ollessa vähintään neljä kertaa suurempi kuin sitraatin konsentraation liuoksessa ennen kuin muutosta siirtymissä havaitaan. Jos metalli-ionin konsentraatio on neljä kertaa suurempi kuin sitraatin, niin sitraatin dupletin duplettina havaittavan

AB-spinsysteemin alemman kentän siirtymien muutos on korkeintaan 0,07 ppm ja Ca^{2+} -ionin suhteen saman spin-systeemin siirtymien riippuvuus on samaan tapaan konsentraatiosta riippuva, joskin pienempi. Muutos on tällöin suurimmillaan 0,04 ppm, mutta se vaikuttaa AB-spinsysteemin molempiin resonansseihin.⁵⁷



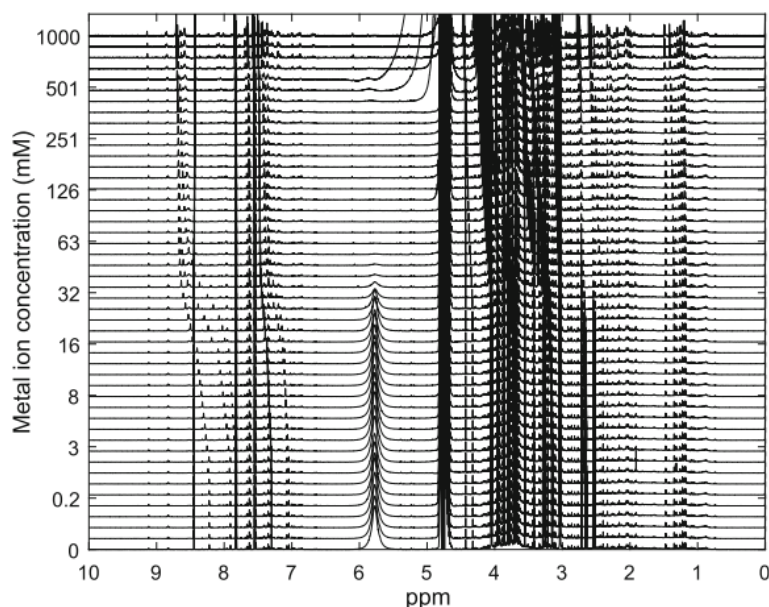
Kuva 32: Muutaman virtsassa esiintyvien metaboliittien ionisoitumattomat rakenteet

Eniten tutkimuksia ionivahvuuden vaikutuksesta on tehty erilaisille virtsassa esiintyville metaboliiteille, kuten formiaatille (muurahaishapon ioni), useille aminohapoille, sitraatille ja laktaatille (maitohapon ioni) (Kuva 35).^{57,64,67} Niille on esitetty, että kalsiumionien läsnäolo vaikuttaisi magnesiumia enemmän protonien resonansseihin ja samalla on todettu, että monovalenttien ionien, kuten Na^+ ja K^+ :n, vaikutus on magnesiumia ja kalsiumia pienempi (Taulukko 3).⁶⁴ Tulokset vastaavat odotuksia, sillä divalentit ionit ovat monovalentteja elektronegatiivisempia ja vaikuttavat näin voimakkaammin ytimen elektronitiheyteen.

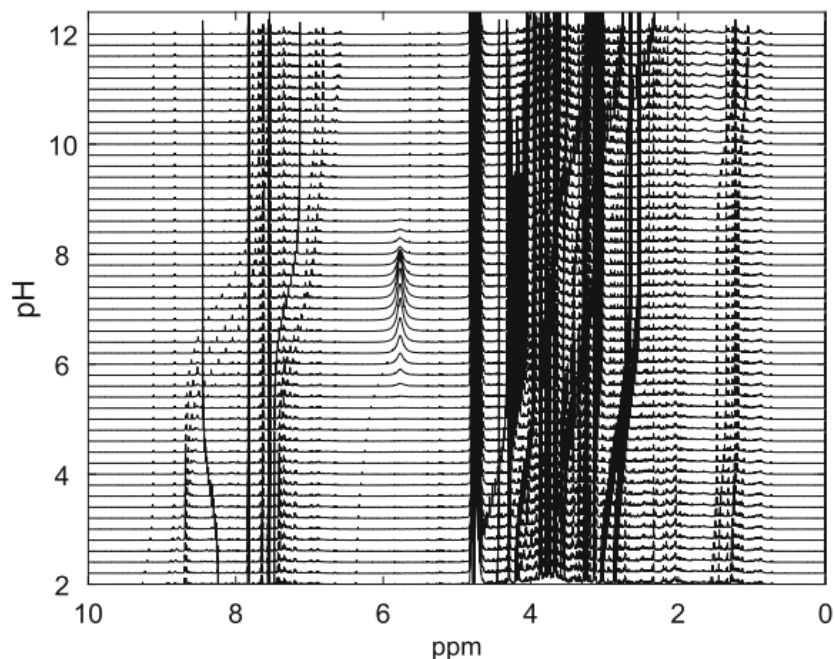
Taulukko 3: Ionien aiheuttama kemiallisen siirtymän muutos suurimmillaan virtsassa havaittavien metaboliittien protonien siirtymille ionien konsentraatiovälillä 0.01-1.0 mM⁶⁴

Ioni	Siirtymän muutos
Ca ²⁺	0,99
Mg ²⁺	0,76
Na ⁺	0,33
K ⁺	0,24

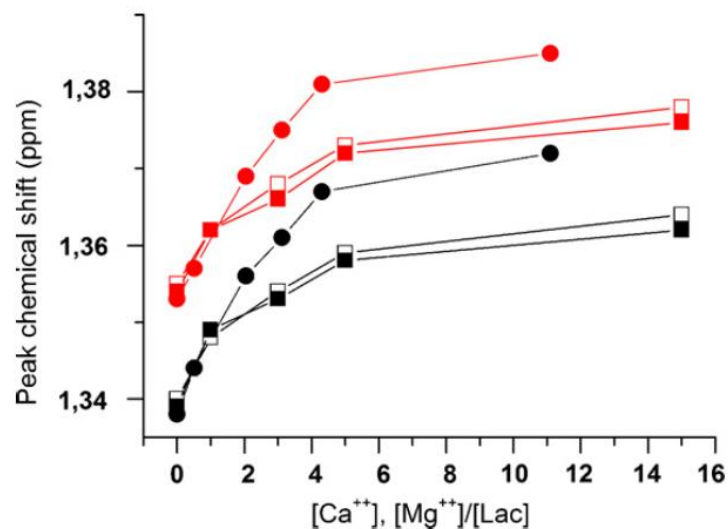
Virtsan metaboliittien tapauksessa suurimmat siirtymien muutokset ovat tyypillisesti havaittavissa atsoalin sukuisille yhdisteille, kuten histidiinille ja sen johdannaisille.⁶⁴ Kalsiumionin konsentraation vaikutus virtsasta ajettuun protonispektriin on esitetty Kuvassa 32 ja vertailun vuoksi samojen metaboliittien pH-sarja on esitetty Kuvassa 33.⁶⁴



Kuva 33: Ca²⁺ ionin konsentraation vaikutus virtsassa esiintyvien metaboliittien protonispektrin kemiallisiin siirtymiin konsentraatiovälillä 0,01-1000 mM Ca₂Cl₂:lla säädettyinä (Kuva: G. D. Tredwell, J. G. Bundy, M. De Iorio ja T. M. D. Ebbels, *Metabolomics*, 2016, **12**, 1–10.)



Kuva 34: Virtsan metaboliittien protonien kemialliset siirtymät pH-välillä 2-12 (Kuva: G. D. Tredwell, J. G. Bundy, M. De Iorio ja T. M. D. Ebbels, *Metabolomics*, 2016, **12**, 1–10.)



Kuva 35: Laktaatin CH₃:n dupletin piikkien muutokset ionikonsentraation suhteen virtsanäytteessä. Kuvassa ympyrät edustavat Ca²⁺:n ja neliöt Mg²⁺:n aiheuttamaa muutosta. Ympyrät ja valkoiset neliöt mitattu pH:ssa 5 ja mustat ja punaiset neliöt on mitattu, kun pH=7 (kuva: A. Beneduci, G. Chidichimo, G. Dardo ja G. Pontoni, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **685**, 186–195.)

Ionivahvuuden vaikutuksen minimoimiseksi häiritsevien ionien konsentraatiota voidaan yrittää vähentää erilaisin tavoin. Metallioneja voidaan jossain määrin erottaa näytteestä erilaisilla ioninvaihtoresiineillä⁶⁹ ja esimerkiksi Ca^{2+} ja Mg^{2+} ionit voidaan kelatoida lisäämällä näytteeseen EDTA:a.^{69,70} EDTA:n käyttöä rajoittavat kuitenkin mahdolliset piikkien päällekkäisyydet, sillä sen lisäyksen jälkeen näytteen protonispektrissä havaitaan sekä sen vapaan että sitoutuneen muodon resonanssit. Myös deuterioitua EDTA:a on kaupallisesti tarjolla, mutta hintavuutensa vuoksi se ei aina ole sopiva ratkaisu ionivahvuuden pienentämiseen.

Vesinäytteissä kalsium- ja magnesiumioneja voidaan myös poistaa muodostamalla niistä veteen liukenemattomia fluorideja, jotka voidaan sitten sentrifugoida näytteestä. Tämän toteuttamiseksi näytteeseen on kuitenkin lisättävä esimerkiksi NaF tai KF suoloja, jolloin Na^+ ja K^+ ionien konsentraatio voi nousta häiritseväksi, minkä vuoksi joissain tapauksissa suositeltavampaa olisi käyttää esimerkiksi kelatoinnin ja edellä kuvatun ulossuolauksen yhdistelmää.^{64,67}

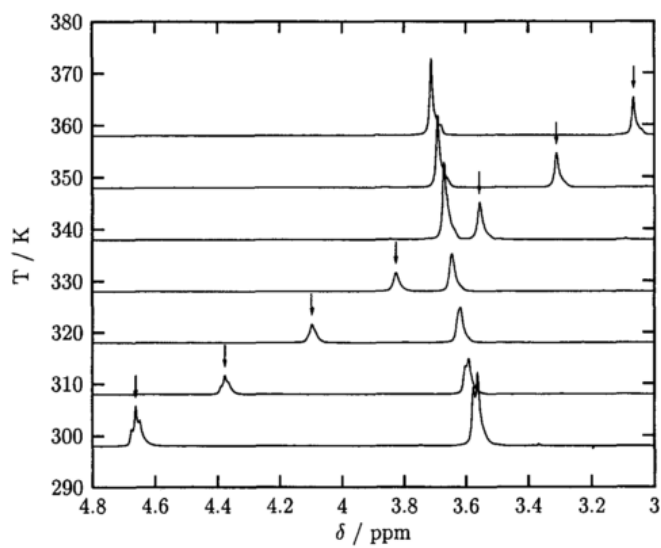
Konsentraation, pH:n ja ionivahvuuden vaikutukset ovat siis merkittävät useille eri yhdisteryhmille ja ne sitoutuvat herkästi toisiinsa vaikeuttaen joissain tapauksissa ennusteiden tekemistä sekä riippuvuuksien tutkailua. Käytännön työskentelyssä onkin syytä pyrkiä minimoimaan nämä vaikutukset pitämällä pH joko neutraalina tai tutkitun yhdisteen pK_a -arvosta huomattavasti eroavana, olemalla nostamatta konsentraatiota huomattavan suureksi ja pyrkimällä mahdollisimman pieneen suolakonsentraatioon mahdollisen näytteen esikäsittelyn kautta. Tapauksissa, joissa näin ei voida toimia, suureksi avuksi voivat osoittautua laskennalliset mallit siitä, kuinka siirtymät riippuvat edellä mainituista parametreista.

3.2.5. Lämpötila

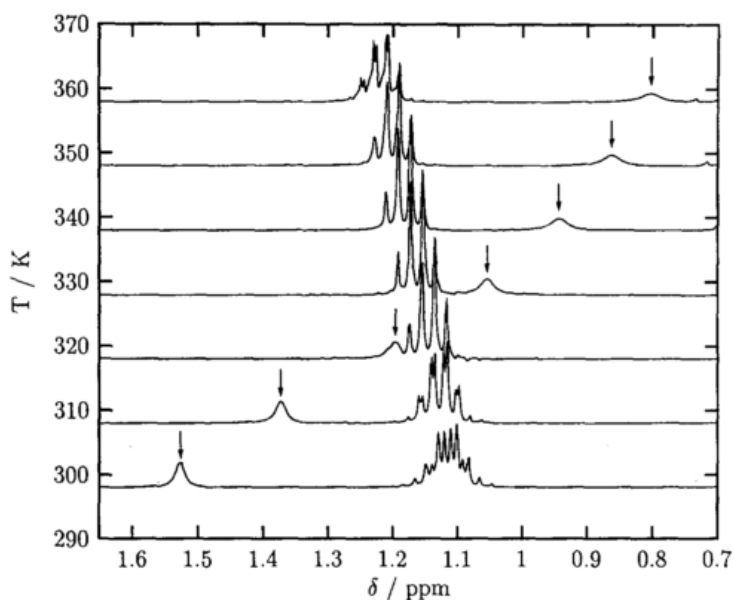
Lämpötila voi vaikuttaa kemialliseen siirtymään siinä missä muutkin parametrit, mutta se on helpoimmin hallittavissa oleva muuttuja, joka voidaan pitää vakiona suoritettaessa mittauksia eri näytteille. Lämpötilan vaikutus siirtymiin selittyy lähinnä vuorovaikutusten määrän muutoksella, sillä jos näytemolekyylillä on taipumusta vetysitoutumiseen, vähenevät vuorovaikutukset lämpötilan noustessa. Muita vaikuttavia tekijöitä ovat esimerkiksi konformaatio- ja tautomeeritasapainojen sekä efektiivisen pH:n muuttuminen lämpötilan muutoksen myötä. Kaikkien edellä mainittujen tekijöiden myötä protonispektrissä havaitaan ytimen varjostuksen kasvamisen myötä tapahtuvat siirtymän pieneneminen ja sen vuoksi on esitetty, että siirtymien lämpötilariippuvuus olisi kytköksissä käytössä olevaan liuottimeen.^{32,44,45, 21,71} Osittain oletuksen voidaan sanoa olevan oikea, mutta toisaalta on myös todistettu, että liuottimen vaikutus ei puhtaasti selitä lämpötilan aiheuttamia muutoksia, varsinkaan matalassa lämpötilassa.⁷²

Esimerkiksi metanolia, etanolia ja isopropanolia tutkittaessa on todettu OH-ryhmän siirtymän pienenevän liuoksen tiheyden pienetessä eli lämpötilaa nostettaessa välillä 298-673 K. Tällöin on esitetty nimenomaan, että siirtymien muutos saattaisi liittyä vetysitoutumisen määrän muutokseen lämpötilan vaihtuessa. Samalla vaihtumattomien protonien, kuten metyylien, signaalit ovat pysyneet kautta tutkitun lämpötila-alueen lähes samoina. Samassa koejärjestelyssä etanolin CH₂- ja isopropanolin CH-protonien signaalien suhdetta metyyლისignaleihin on tutkittu ja todettu etäisyyden muutosten olleen alle 0,1 ppm:n suuruisia. Keskimäärin siirtymät olivat siis pysyneet samalla etäisyydellä toisistaan kautta eri lämpötilojen.⁴⁴ Varsinkin pienten alkoholien tapauksessa pitääkin paikkansa, ettei vaihtumattomilla protoneilla ole havaittavissa samanlaista lämpötilariippuvuutta kuin hydroksyylin protonilla. Toisaalta

bentsyylialkoholin tapauksessa hienoista CH_2 -piikin arvon kasvua lämpötilaa nostettaessa on havaittu välillä 290-380 K (Kuva 36). Samanlainen havainto voidaan tehdä 2,2-dimetyyli-3-etyyli-3-pentanolin (DMEP) tapauksessa (Kuva 37).⁷¹

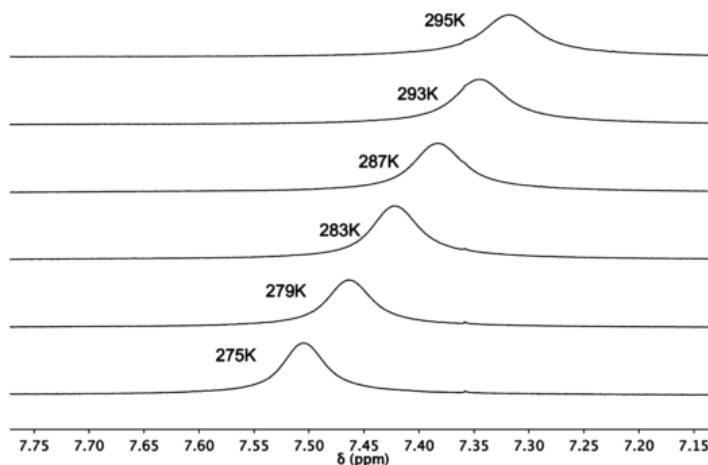


Kuva 36: Nestemäisen bentsyylialkoholin kokeelliset spektrit lämpötilavälillä 290-380 K käytettäessä TMS:a sisäisenä referenssinä, jossa nuolella merkatut piikit kuuluvat hydroksyyliprotonille ja muut resonanssit CH_2 -rakenteelle. (Kuva M. Hulsekopf ja R. Ludwig, *J. Mol. Liq.*, 2000, **85**, 105–125)⁷¹



Kuva 37: Nestemäisen DMEP:n kokeelliset protonispektrit lämpötilavälillä 290-370 K, jossa nuolella merkityt resonanssit kuuluvat hydroksyyllille. Sisäisenä referenssinä TMS. (Kuva M. Huelsekopf ja R. Ludwig, *J. Mol. Liq.*, 2000, **85**, 105–125)⁷¹

Vetysidosten merkitys voidaan havaita myös esimerkiksi pitkillä diamideilla, joiden intramolekulaarinen vetysidos johtaa rengasrakenteeseen. Tällöin amidin vaihtuvan protonin, joka ottaa osaa sidokseen, siirtymä on pienempi kuin suoraketjuisessa muodossa (Kuva 38)⁴⁵



Kuva 38: N,N-dimetyylimalonamidin ^1H NMR spektrin amidiprotonin resonanssialueelta CD_2Cl_2 :ssa lämpötilavälillä 275–295 K. (Kuva J. G. Morton, C. L. Joe, M. C. Stolla, S. R. Koshland, C. H. Londergan ja M. H. Schofield, *J. Chem. Educ.*, 2015, **92**, 1086–1090.)⁴⁵

Lämpötila vaikuttaa myös J-kytkentöjen suuruuteen, joskaan muutos ei ole pienillä vaihtelualueilla huomattavan suuri. Visinaaliset ja viiden sidoksen yli olevat J-kytkennät pienenevät noin 0.01 %/K ja neljän sidoksen ylitse olevat J-kytkennät taas suurenevat noin 0.02 %/K.⁷³ Muutoksen suuruus voi kuitenkin jäädä myös havaitsematta, sillä lämpötilaa nostettaessa resonanssien hienorakenne saattaa myös heikentyä ja piikin muoto näin ollen levetä lähes tunnistamattomaksi.²¹

Lämpötilan huomattava muutos etenkin vaihtuvien protonien resonansseihin on hyvä syy pitää lämpötila vakiona mittauksia suoritettaessa, kuten tyypillisesti tehdäänkin. Kuten aikaisemmin mainittiin, on lämpötilan hallinta onneksi suhteellisen yksinkertaista muiden parametrien kanssa työskentelemiseen verrattuna, joten lämpötilan muutos harvemmin aiheuttaa ongelmia kokeellisessa työskentelyssä.

3.3. Yhteenveto parametrien vaikutuksesta kemiallisiin siirtymiin

Kemiallisen siirtymän riippuvuus eri tekijöistä ei ole aina täysin ennustettavissa, etenkin, jos kyseiseen yhdisteeseen ei ole liitettävissä riittävästi kokeellista dataa, jolle oletuksia voisi pohjata. Tietyllä tasolla suhteellisen luotettavia trendejä voidaan esittää (Taulukko 4, sivu 75), mutta silloinkin on muistettava ottaa huomioon yksittäiseen näytteeseen liittyvät tekijät ja muuttujat, joiden vuoksi kemiallisen siirtymän riippuvuus voi poiketa muista yhdisteryhmistä. Yleistykset sopivatkin pääosin suuntaviivoiksi, joita käyttää odottamattomien muutosten havaintojen alustavaan tulkintaan ja joiden avulla tarkempia riippuvuuksia voidaan siirtyä tutkimaan laskennallisin menetelmin.

Taulukko 4: Yhteenvedo esitellyistä parametreista sekä niiden tyypillisistä vaikutuksista kemiallisiin siirtymiin

Parametri	Parametrin vaikutus kemialliseen siirtymään sekä muita huomioita
Rakenteet jännittyneisyys	Mitä jännittyneempi rakenne ja korkeaanerisempi konformaatio, sitä enemmän siirtymä pienenee. Huomattavissa etenkin rengasrakenteiden hiilispektreissä. ¹⁰
Tautomeria	Siirtymä voi muuttua riippuen eri tautomeerien vuorovaikutuksesta toistensa ja liuotinmolekyylien kanssa. ²¹
Substituentit	Elektronegatiiviset substituentit pienentävät lähellä olevien ytimien varjostusta ja kasvattavat siirtymää, kun taas elektroposiitiivisilla vaikutus on päinvastainen. ²² Vahvasti konjugoituineissa rakenteissa substituenttivaikutus voidaan havaita tavallista kauempana oleville ytimille. ²³
Dimerisoituminen ja polymeroituminen	Dimerisoituminen ja polymerisoituminen kasvattavat ytimen siirtymän arvoa, jos kyseessä ei ole aromaattinen yhdiste, jonka polymeeri π -pinoutuu itsensä kanssa. ¹⁹
Liuotin	Liuotimen vaikutus siirtymiin on keskimäärin suurempi protoni- kuin hiilispektrissä. Kun liuotimen ja analyysin välisten vetysidosten määrä kasvaa, kasvaa myös siirtymä. Vastaavasti muut vuorovaikutukset vaikuttavat siirtymiin ja esimerkiksi aromaattisille yhdisteille aromaattisissa liuotimissa siirtymät pienenevät, polaarissa liuotimissa niiden siirtymät pienenevät ja polaarittomissa liuotimissa vaikutuksen suuruus on pienempi.
π -pinoutuminen	Pinoutumisen lisääntyessä siirtymä pienenee. ^{28,38,39}
Vetysitoutuminen (intra- ja intermolekulaarinen)	Vetysidoksen muodostuminen pienentää elektronegatiivisen ytimen (N, O, F) siirtymää ja kasvattaa protonin siirtymää. ^{44,43} Lisäksi vaihtuvien protonien resonanssit levenevät vetysitoutumisen myötä. ⁴³ Intramolekulaarisen vetysitoutumisen tapauksessa havaittu siirtymä on syklisen- ja vapaan muodon siirtymien painotettu keskiarvo. ⁴⁵
Konsentraatio	Konsentraation kasvaessa heikkojen vuorovaikutusten määrä ja mahdollisesti dimerisaatio lisääntyvät ja vaikutus siirtymään on sen mukainen. Esimerkiksi vetysitoutuminen lisääntyy konsentraation kasvun myötä, jolloin siirtymä kasvaa protoneilla, jotka ottavat osaa sidokseen.
pH	pH:n laskeminen johtaa suurempaan vetysidosten määrään ja protonisiirtymien kasvuun sidoksia muodostavilla yhdisteillä. Vaikutus siirtymään riippuu siitä, kuinka lähellä protonoituvaa kohtaa ydin on, ja sen suuruus voidaan laskea mukautetun Henderson-Hasselbalch-Yhtälön (21) mukaan. ^{58,59,60,62}
Ionivahvuus	Ionivahvuuden merkitys perustuu tutkittavan yhdisteen ja ionien kompleksimuodostukselle. ⁶⁷ Maa-alkalimetallien, kuten Ca^{2+} ja Mg^{2+} :n tapauksessa ionivahvuuden kasvu johtaa suurempiin protonisiirtymiin. ^{57,64,67}
Lämpötila	Vaikutus perustuu vuorovaikutusten määrään muutokseen ja esimerkiksi vetysitoutuminen vähenee lämpötilan noustessa pienentäen protonien siirtymiä. ^{32,44,45, 21,71}

4. Yleistä kemiallisen siirtymän ennustamisesta

Vaikka NMR-spektroskopia on tärkeä menetelmä näytteessä olevien molekyylien tutkimiseen ja erityisesti tuntemattomien yhdisteiden rakenteiden määrittämiseen, voi rakennemäärittäminen olla joissain tapauksissa haastavaa. Esimerkiksi monomeerin erottaminen dimeeristä tai symmetrisen rakenteen oikea määrittäminen on vaikeaa pelkästään NMR-spektrin pohjalta ja siksi tarvitaan tulkintaa tukevaa tietoa muilla analyysitekniikoilla. Myös yhdisteen resonanssien havaitut kemialliset siirtymät saattavat poiketa oletetusta, jos näyteolosuhteita ei tunneta tarkasti. Tutkimusta voidaan helpottaa esimerkiksi simuloimalla oletetun yhdisteen spektri, jota verrataan kokeelliseen dataan, jotta nähtäisiin, ovatko oletetun yhdisteen siirtymät läheskään samat kuin kokeellisesti saavutetut arvot. Spektrin simulointi tehdään laskemalla yhdisteen ytimille tarvittavat spektriparametrit, joiden pohjalta voidaan ennustaa kemialliset siirtymät. Ennusteiden tekemiseen käytettyjä tapoja ovat erilaiset empiiriset tai kvanttimekaaniset menetelmät, jotka jaotellaan edelleen tietokantapohjaisiin ja inkrementaalisiin menetelmiin, neuroniverkkoihin sekä *ab initio*- tai tiheysfunktionaalilaskuihin pohjautuviin menetelmiin. Tarkemmin siirtymien ennustusta käsitellään kappaleessa ”7. Kemiallisen siirtymän ennustamiseen käytetyt laskennalliset menetelmät”.

Yhdisteen spektrin simuloiminen on hyödyllinen sovellus, joka koostuu useista osatekijöistä. Kokonaista spektriä varten ennusteeseen tulisi sisällyttää muun muassa yhdisteen spinsysteemi, kemialliset siirtymät ja kytkentävakiot, jotta tuloksena saatu spektri vastaisi parhaiten kokeellisia tuloksia ja jotta sitä voitaisiin tätä kautta käyttää hyödyksi esimerkiksi tuntemattomien yhdisteiden analyysissä tai kokeellisen spektrin resonanssien assignoinnissa. Ennustusmenetelmiä on monia, joista osa soveltuu toisia paremmin yksittäisten yhdisteiden tapauksiin.

Laajalti tunnetun yhdisteen kemiallisten siirtymien ennustus on usein helpompaa kuin vähemmän tutkitun yhdisteen tapauksessa, sillä kokeellisen vertailudatan määrä helpottaa menetelmien kouluttamista ja näin ollen tarkkuutta. Lisäksi vertailudata mahdollistaa ennusteen todenmukaisuuden tarkastelemisen ja tätä kautta antaa viitteitä siitä, miten menetelmää voitaisiin parantaa. Harvinaisemman yhdisteen tapauksessa vertailudatassa joudutaan turvautumaan samantyyppisten yhdisteiden kokeelliseen dataan, mutta jopa näissä tapauksissa erityisesti erilaiset laskennalliset menetelmät ovat osoittautuneet luotettaviksi ja tarkoiksi kemiallista siirtymää ennustettaessa.

Kemiallisen siirtymän ennustusmenetelmät voidaan jakaa suoriin tietokantahakuihin ja laskennallisiin menetelmiin,⁷⁴ joista suora tietokantahaku ei varsinaisesti ole ennustusmenetelmä, vaan pohjaa pelkästään siihen, onko käytettävässä kannassa halutun yhdisteen kokeellista spektriä halutuissa oloissa. Laskennalliset menetelmät puolestaan voidaan jakaa empiirisiin ja kvanttimekaanisiin menetelmiin, jotka molemmat jakautuvat edelleen useampaan haaraan,⁷⁵ joista yksi onkin tietokantojen käyttö niin sanotusti laskennallisesti tehostettuna. Menetelmiä löytyy sekä kaupallisia että ilmaisia ja ne tarjoavat yleensä ottaen tarkan ja nopean arvion tutkitusta kemiallisesta siirtymästä käyttäjälleen, varsinkin, jos kohdeyhdiste on rakenteeltaan suhteellisen tavallinen ja jos tietokantahakuun tai funktioiden kouluttamiseen käytetty tietokanta pitää sisällään sitä läheisesti muistuttavia yhdisteitä siirtymineen. Jos tutkittu yhdiste ei ole yleinen tai käytetty tietokanta on tarkoitukseen vajavainen, voi ennuste poiketa todellisista siirtymän arvoista huomattavastikin.^{76,12}

Menetelmien kehitysvaiheessa laskennallisia tuloksia verrataan vastaaviin todellisiin arvoihin, kunnes hyväksyttävän pienet virherajat saavutetaan. Myös useampia menetelmiä tutkittaessa rinnakkain saatuja tuloksia usein verrataan kokeelliseen dataan, jotta saatujen ennusteiden todenperäisyys varmistettaisiin.^{15,77,17} Rakenne-analyttisissä tutkimuksissa erilaisia NMR-kokeita voidaan käyttää tarpeen mukaan ja jokaisen ytimen tutkimisella on omat etunsa, kuten ^1H -ytimien 1D-spektrien tyypillisesti nopeat mittausajat ja ennusteita tehtäessä laskujen helppous tai ^{13}C -ytimien siirtymien tapauksessa protonispektreihin verrattuna parempi toistettavuus ja laajempi mittausväli.⁷⁸ Tämän vuoksi on hyödyllistä, että kehitetyt ennustusmenetelmät toimivat keskimäärin kaikille NMR-aktiivisille ytimille, vaikka osa menetelmistä soveltuukin tehtävään toisia paremmin tilanteesta riippuen.

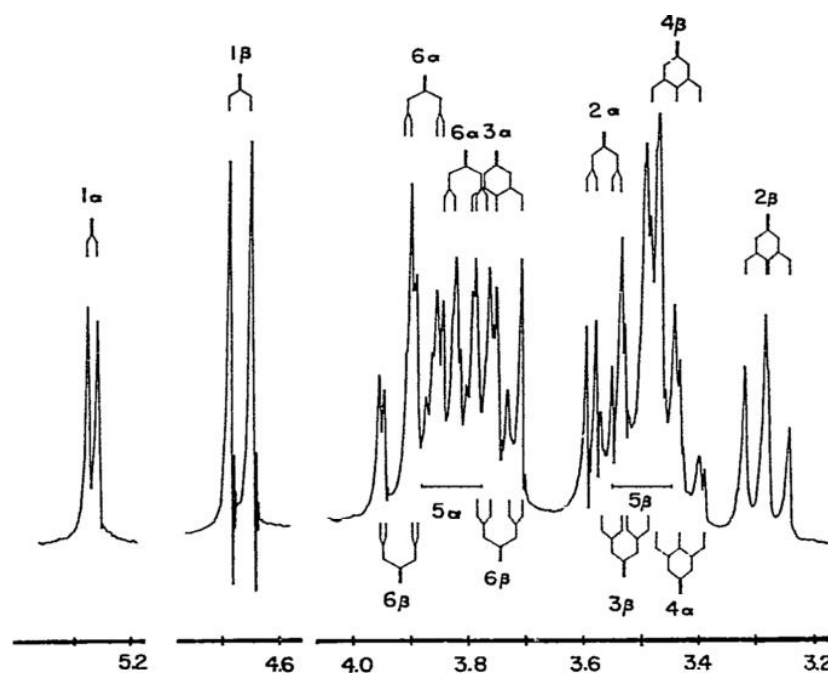
5. Kemiallisten siirtymien ennusteiden tekoon liittyvät ongelmat ja haasteet

Vaikka ennusteiden tekemiseen on nykyään useita erilaisia tekniikoita, niin kemiallisen siirtymän herkkyys eri parametreille vaikeuttaa asiaa sekä monimutkaistamalla laskuja että aiheuttamalla virhettä tuloksiin, jos riittävän laajaa kokeellista vertailukantaa siirtymistä ei ole käytettävissä. Etenkin tietokantahakujen tapauksessa virheen suuruus voi olla huomattava, jos spektrikirjasto ei sisällä tutkitun yhdisteen tai sen sukulaisrakenteiden spektrien osalta laajaa valikoimaa erilaisissa olosuhteissa. Laskennallisten menetelmien tapauksessa siirtymän herkkyys eri parametreille on otettava huomioon esimerkiksi erilaisin uusin tekijöin ja painotuksin ja rakenteen monimutkaistuessa laskujen optimointi nousee entistä tärkeämpään asemaan. Laskuissa on otettava huomioon, mitkä tekijät aiheuttavat huomattavissa määrin muutosta siirtymään ja minkä mukaan lukeminen vain aiheuttaa enemmän epätarkkuutta tuloksiin.

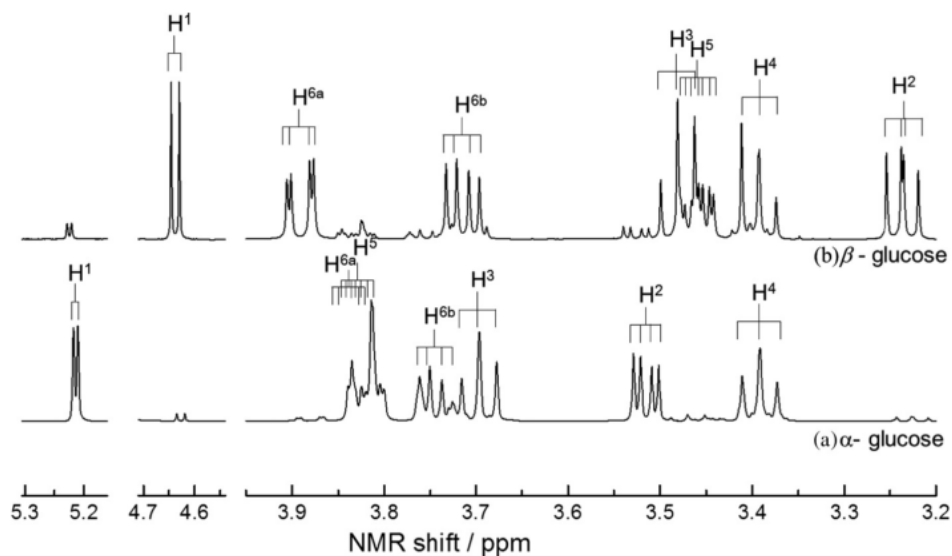
Kokeellisten vertailuspektrien soveltaminen rakenneanalytiikassa voi osoittautua haastavaksi, sillä useiden tekijöiden, kuten pH:n, liuottimen, lämpötilan, sekä muiden läsnä olevien yhdisteiden optimointi samoiksi kuin näyteliuoksessa on joissain tapauksissa lähes mahdoton tehtävä.^{76,17,79} Erityisesti perinteisille empiirisille malleille monimutkaisemman rakenteen tai näyteympäristön huomioon ottaminen muuttuu herkästi turhankin haastavaksi, minkä vuoksi muita ennustustekniikoita suositaan haastavampien näytteiden yhteydessä. Siirtymien liikkuminen spektrialueella voi johtaa piikkien päällekkäisyyksiin, jolloin pienen intensiteetin piikki saattaa näennäisesti kadota suuremman alle, varsinkin jos kahden piikin intensiteettiero on huomattava ja suurempi on leventynyt,⁵⁵ joten eri parametrien vaikutus on otettava huomioon sekä käytännön työskentelyssä että ennustetta tehtäessä.

Yksi suurimmista ennusteiden haasteista on laskea siirtymä alifaattiselle protonille, joka on sitoutunut sp^3 -hybridisoituneeseen hiileen, koska tällöin vaihtoehdot yleisen rakenteen ja konformaation suhteen ovat laajat ja vapaan energian laskeminen on vaativaa. Lisäksi substituenttien vaikutus on suuri, muttei lineaarinen, joten vaihtoehtoisia vaikutusmalleja on lukemattomia. Tällöin ennustetta voidaan korjata vain yhdistämällä lineaarisia malleja muihin menetelmiin, joilla tuloksia korjataan.¹⁷

Protonien siirtymien tarkka ennustaminen on suhteellisen tuore sovellus, sillä vielä 1990-luvun puolella tarkkojen ennusteiden tekemisessä oli ongelmia kvanttimekaanisten menetelmien tai tietokantahakujen perusteella.^{17,30} Muita ennusteiden ongelmia voivat olla yksittäiset rakenteet, jotka esiintyvät erilaisina isomeereinä, joiden ydinten kemialliset siirtymät joko sijaitsevat lähellä toisiaan tai ovat jopa osittain päällekkäin. Tällaisten yhdisteiden spektrin laskemiseksi on huomioon otettava entistä enemmän tekijöitä ja myös esimerkiksi isomeerien konsentraatioiden suhde on lisättävä laskuihin. Yksi tällainen yhdiste on glukoosi, jonka kokeellisessa protonispektrissä näkyvät tyypillisesti samanaikaisesti sekä α - että β -anomeerien siirtymät (Kuva 39 ja Kuva 40).^{80,81,82}



Kuva 39: Osittainen glukoosin ^1H NMR spektri, jossa on nähtävissä päällekkäisiä α - ja β -D-glukoosin resonansseja D_2O :ssa. Spektri on ajettu 220 MHz:n laitteella 60°C :ssa (kuva: H. J. Koch ja A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.*, 1970, **15**, 403–410.)



Kuva 40: β - ja α -glukoosin ^1H NMR spektrit D_2O :ssa 500 MHz:n laitteella mitattuna 25°C :ssa. Kuvassa β -glukoosin spektri on esitetty ylempänä ja α -glukoosin alempana (kuva: A. Kosaka, M. Aida ja Y. Katsumoto, *J. Mol. Struct.*, 2015, **1093**, 195–200.)

Yhdeksi ongelmista voitaisiin mieltää myös vertailudatan määrä ja laatu, etenkin monimutkaisempien rakenteiden tapauksissa. Jos kokeellisen spektrin resoluutio ei ole riittävä, voivat huonot viivanmuodot vaikeuttaa lainalaisuuksien havaitsemista ja tarkkojen johtopäätösten vetämistä. Tällöin vertailu kokeellisen datan ja laskettujen tulosten välillä voi olla haasteellista ja jopa harhaanjohtavaa. Kokeellisen datan laatu nousee tärkeäksi myös ohjelmistojä koulutettaessa, sillä huonosti koulutettu ohjelmisto ei luonnollisestikaan anna osuvia tuloksia, vaan tarjoaa vain suuntaa-antavia arvioita siirtymästä. Enemmän ohjelmistojen koulutusta käsitellään kappaleessa ”7. Siirtymien ennustamisen käytetyt laskennalliset menetelmät” sekä sen alakappaleissa.

6. Ennusteiden sovellukset nykyään sekä kehitysmahdollisuudet tulevaisuudessa

Spektrin simuloiminen molekyylirakenteen pohjalta on tärkeä työkalu NMR-spektrien tulkinnassa. NMR-spektrin simuloimiselle on olemassa useita sovelluksia, kuten sen käyttö tuntemattoman yhdisteen rakenneanalyysiin ja tunnistamiseen, virheellisen kirjastodatan korjaamiseen tai kokeellisen datan resonanssien yhdistäminen oikeisiin ytimiin. Useimmat menetelmät sopivat yleisesti kaikkiin edellä mainittuihin tarkoituksiin, mutta soveltuvuus kuhunkin tarkoitukseen määräytyy menetelmän tarkkuuden tai sen käytön helppouden mukaan. Sovellusten määrä on vuosien saatossa laajentunut menetelmien kehittyessä, kun niiden antamat tulokset tarkentuvat. Myös menetelmien yhdistäminen laajentaa käyttömahdollisuuksia ja parantaa tuloksia, jos menetelmiä käytetään korjaamaan toistensa puutteita.

Ennustetta voidaan käyttää hyödyksi esimerkiksi tapauksissa, joissa halutaan tunnistaa tuntematon yhdiste spektrin perusteella. Tätä onkin käytetty hyödyksi jo pitkään ja ennustusmenetelmien kehittyessä rakenteen määrittäminen niiden perusteella on jatkuvasti helpottunut.⁸³ Oikean rakenteen määrittäminen spektrin perusteella toteutetaan tyypillisesti simuloimalla spektri kahdelle tai useammalle vaihtoehtoiselle rakenteelle, joiden oletetaan olevan rakenteellisesti lähellä kohdeyhdistettä, ja vertaamalla sitten saatuja spektrejä kokeellisen datan kanssa.^{84,85,77} Tällöin vertailu suoritetaan useimmiten ^1H NMR:llä, koska kokeellinen protonispektri on nopeasti saatavissa ja mitattavissa pienillä näytemäärillä⁷⁶ ja protonisiirtymien ennustamiseen on tarjolla monia hyvin toimivia menetelmiä. Tunnistus voidaan suorittaa myös hiilispektrin tai useamman eri spektrin tietojen yhdistämisen pohjalta.

Muiden kuin protonispektrin käyttäminen yhdisteen tunnistukseen tulee tarpeelliseksi varsinkin silloin, kun vaihtoehtoiset rakenteet muistuttavat läheisesti toisiaan. Jos tunnistus tehdään pelkän hiilispektrin pohjalta ilman muiden spektrien tarjoamaa informaatiota, niin rakennetta etsitään yleensä rajatusta yhdistejoukosta, joiden spektrit tunnetaan jo entuudestaan hyvin.^{37,86} Rakenteen yhdistäminen oikeaan spektriin ennusteen pohjalta toimii hyvin esimerkiksi isomeerien tapauksessa laskemalla siirtymät ytimille empiirisin menetelmin ja yhdistämällä tämä data kvanttimekaanisesti laskettuihin kytkentävakioihin.⁷⁶

Simuloituja spektrejä voidaan siis käyttää spektrin liittämiseen oikeaan rakenteeseen, mutta sen lisäksi siirtymien ennusteiden avulla on mahdollista suorittaa tarkempaa siirtymien assignointia. Kunkin resonanssin yhdistäminen sitä vastaavaan rakenteen ytimeen auttaa muun muassa ymmärtämään eri parametrien vaikutusta resonanssien käyttäytymiseen. Tämä johtaa laajempiin tutkimusmahdollisuuksiin, sillä

jos tutkitun yhdisteen siirtymien käytös erilaisissa olosuhteissa tunnetaan, on mahdollista selvittää siirtymien pohjalta eri tekijöitä, kuten yhdisteen pKa tai näytteen pH, konsentraatio tai ionivahvuus, kunhan pohjalle on kerätty tarpeeksi kokeellista dataa, jolle ennusteet ja simulaatiot perustuvat. Lisäksi assignoinnin, ja tätä kautta ennusteiden, avulla kyetään korjaamaan virheellistä tietoa, joita toisinaan jopa kirjallisuudesta on löydettävissä.^{17,12} Myös molekyylin mahdollisia konformaatioita näyteliuoksissa voidaan tutkia assignoinnin avulla helpommin, kun laskettuja siirtymiä voidaan verrata kokeelliseen dataan.⁸⁷

Siirtymien ennusteita voidaan käyttää selventämään spektridataa tavalla, johon edes kaksiulotteiset NMR-spektrit eivät kykene. Tämä havainnollistuu monimutkaisten molekyylien tapauksessa, jossa ennusteiden avulla voidaan simuloida esimerkiksi pientenkin rakenteellisten ja konformationaalisten²⁰ muutosten vaikutusta spektriin ja osoittaa epäilyksettä kytköksiä, joita käytännön kokeiden perusteella ei aina voida tehdä.¹² Spektrin liittäminen rakenteeseen ennusteiden perusteella ei kuitenkaan ole täysin ongelmaton, vaan tässäkin tapauksessa on muistettava, että liian suuret virherajat ja liian pienet vertailukohdat kokeellisiin tuloksiin voivat johtaa myös virheellisiin assignointeihin.⁸⁸

Näyteliuoksen ominaisuuksien tutkimisen lisäksi ennusteita voidaan käyttää myös intramolekulaaristen vuorovaikutuksen tutkimiseen, kuten tapauksissa, joissa aromaattiset rakenteet joko yhdessä rakenteessa⁸⁹ tai kahdessa erillisessä molekyylissä³⁵ pinoutuvat. Samaan tapaan myös muita intra- ja intermolekulaarisia vuorovaikutuksia on suhteellisen helppo tutkia ja tätä sovelletaankin erityisesti hiilihydraattien⁹⁰ ja esimerkiksi kasvikunnan tuottamien yhdisteiden³⁸ tutkimuksessa. NMR sopii tehtävään mainiosti, koska kemialliseen siirtymään ja visinaalisten J-kytkentöjen

suuruuteen vaikuttavat niin monet rakenteelliset ja konformaatioon liittyvät tekijät, kuten aikaisemmissa kappaleissa on osoitettu. Myös vetysitoutumisen määrää ja erotusta intra- ja intermolekulaaristen vetysidosten välillä voidaan tutkia, sekä selvittää sitoutumiseen liittyviä tasapainovakioita sekä reaktioiden entalpia- ja entropiamuutoksia.³²

Eri ennustemenetelmiä on onnistuneesti yhdistetty esimerkiksi tapauksissa, joissa tietokantahakuihin on liitetty inkrementaalisia menetelmiä tai kvanttimekaanisia laskuja, jolloin toisella menetelmällä saavutetaan tietoja, joita ei yksittäisin empiirisin menetelmin voida tutkia. Menetelmiä käytetäänkin suhteellisen usein tukemaan toisiaan tai vahvistamaan toistensa perusteella laskettuja tuloksia. Tällöin tavoitteena on yhdistää kunkin käytetyn menetelmän hyvät puolet ja näin parantaa ennusteen tarkkuutta ja laskujen tehokkuutta mahdollisimman pienellä hinnalla.^{74,17}

Pitkällisen kehityksen tuloksena menetelmät tarjoavat nykyään hyvinkin tarkkoja ennusteita kemiallisesta siirtymästä, mutta siitä huolimatta kehitykselle on aina varaa. Menetelmien parantamiseen käytetäänkin kokeellista dataa, koska ilman todellisia vertailuarvoja menetelmiä voidaan kehittää vain tiettyyn pisteeseen asti. Kokeellista dataa käytetään sekä ohjelmistojen niin sanottuun kouluttamiseen että tulosten tarkasteluun, jotta menetelmän tarkkuus voidaan määrittää. Tämän vuoksi tulevaisuudessa eri menetelmien kehitykseen vaikuttaa vahvasti kokeellisen datan saatavuus ja luotettavuus, koska niiden pohjalta saadaan laskuihin sovellettavaa tietoa parametrien vaikutuksesta siirtymiin ja lisäksi niiden avulla menetelmien osuvuutta ja toimivuutta voidaan parhaiten arvioida.^{12,17}

Ennustusmenetelmien kehittyessä tarvitaan jatkuvasti tarkempaa dataa, jotta siirtymien todenmukaista käytöstä ja riippuvuutta eri parametreista voitaisiin mallintaa entistä paremmin. Korkealaatuisemmat spektrit ovat myös hyödyksi vertailukohtina simuloiduille spektreille ja tietokantojen laajentuminen tarjoaa entistä paremmin mahdollisuuden löytää vähemmän tutkittujen tai monimutkaisten yhdisteiden spektrejä suoraan niitä etsimällä.

7. Siirtymien ennustamiseen käytetyt laskennalliset menetelmät

7.1. Yleistä laskennallisista menetelmistä

Kemiallisten siirtymien ennustamiseen ja tätä kautta NMR-spektrin simuloimiseen käytetyt menetelmät ovat kaikki pohjimmiltaan laskennallisia ja ne voidaan jakaa empiirisiin ja kvanttimekaanisiin menetelmiin. Tämän lisäksi laskennallisiin menetelmiin kuuluvat semi-empiiriset menetelmät, jotka ovat kvanttimekaniikan teorialle pohjautuvia laskuja, joissa kokeellista dataa hyödynnetään ohjelmistojen optimoinnissa ja koulutuksessa tavalla, jota ei puhtaasti kvanttimekaanisissa sovelluksissa tarvita tai käytetä. Empiiriset menetelmät perustuvat kokeelliselle datalle, jonka avulla laskukaavat on hiottu tuottamaan parempia tuloksia tai jonka avulla algoritmeja on koulutettu tehtävänsä, kun taas kvanttimekaaniset laskut pohjautuvat nimensä mukaisesta kvanttimekaanisiin menetelmiin, jolloin kokeellista dataa käytetään lähinnä tulosten tarkasteluun.

Empiiriset menetelmät voidaan jakaa tietokantahakuihin, neuroniverkkojen (eng. neural network) käyttöön ja inkrementaalisiin menetelmiin, kun taas kvanttimekaanisten menetelmät koostuvat *ab initio* ja tiheyfunktionaaliteoriaan (Density Functional Theory, DFT)

perustuvista laskuista.^{75,17} Laskennallisia menetelmiä on kehitetty paljon ja niiden määrä on kasvanut viime vuosina, kun rakenteiden selvittäminen NMR:llä on yleistynyt.⁷⁵ Taulukossa 4 on esitelty eri ennustusmenetelmiä ja niiden tyypillisimpiä sovelluskohteita, sekä viitteitä kutakin menetelmää esittelevään tai soveltavaan kirjallisuuteen. Lisäksi taulukossa viitataan kappaleeseen, jossa kutakin menetelmää tässä tutkielmassa käsitellään.

Taulukko 5: Yhteenveto erilaisista kemiallisen siirtymän ennustamiseen käytetyistä menetelmistä

Luokka	Menetelmä	Kappale	Yleisimmät sovelluskohteet	Viitteet
Empiiriset menetelmät	Tietokantojen käyttö ”laskennallisesti”	7.2.1.	Tunnetut yhdisteet, joista on olemassa paljon kokeellista dataa erilaisissa olosuhteissa. Useimmiten yksinkertaisia rakenteita ja yleisimpiä ytimiä, kuten ^1H ja ^{13}C .	74, 75, 83, 94
	Inkrementaaliset menetelmät	7.2.2.	Hiilihydraattikemia, glykokonjugaatit ja sakkariidit. Yleisemmin ^{13}C -ytimet, mutta myös ^1H - ja ^{19}F -ytimille on tuotettu luotettavia ennusteita.	12, 17, 78, 105
	Neuroniverkot ja geneettiset algoritmit	7.2.3.	Tuntemattomien yhdisteiden ja lääkeaineiden analytiikka sekä yhdisteryhmänä esimerkiksi asyklisten alkeenten siirtymien ennustus.	75, 88, 109, 110
	Kvanttimekaaniset menetelmät	7.3.2.	Kiinteät ja nestemäiset näytteet, laaja kirjo erilaisia yhdisteryhmiä, kuten PAH-yhdisteet, selluloosa ja erilaiset sokerit sekä muut orgaaniset yhdisteet sekä kompleksit. Toisaalta esimerkiksi LSDA menetelmässä konformaation muutosta ei oteta riittävästi huomioon, joten kyseiset laskut soveltuvat lähinnä jäykille rakenteille. Laskut voidaan suorittaa mille tahansa NMR-aktiiviselle ytimelle.	12, 15, 33, 102, 118
Semi-empiiriset menetelmät	<i>Ab initio</i>	7.3.3.	Nestemäiset ja kaasufaasin näytteet, monimutkaisen geometrian omaavat yhdisteet ja muun muassa monimutkaisia vuorovaikutuksia sisältävät kompleksit. Laskut voidaan suorittaa mille tahansa NMR-aktiiviselle ytimelle.	12, 33, 102, 120, 121
	Ohjelmistoina esimerkiksi CHARGE	7.4	Proteiinien tutkimus, pääasiassa ^1H -ytimien ja erilaisten funktionaalisten ryhmien siirtymäennusteet.	12, 15, 33, 75, 96, 102, 126

Kemiallisen siirtymän ennusteen tekeminen alkaa laskuilla, joilla kohdemolekyylin ominaisuudet, kuten varjostus ja kemiallinen ympäristö, parametrisoidaan. Näin saatuja tekijöitä voidaan syöttää sitten kunkin menetelmän ominaisiin algoritmeihin ja laskuihin, jotta kemiallinen siirtymä voidaan simuloida. Ensimmäinen vaihe on rakenteen optimointi, joka on ehdottoman tärkeä vaihe lasketun siirtymän tarkkuuden kannalta,^{91,92} ja se tehdään selvittämällä molekyylin todennäköisin kolmiulotteinen rakenne. Tämä voidaan laskea molekulaarimekaniikan (eng. molecular mechanics), semi-empiiristen menetelmien tai kvanttimekaanisten laskujen perusteella, vaikkakin joissain tapauksissa optimointi voidaan jopa suorittaa kokeellisen datan pohjalta.¹²

Optimointi on syytä tehdä erityisesti tapauksissa, joissa eri menetelmin laskettuja tuloksia halutaan verrata toisiinsa. Se voidaan tehdä esimerkiksi laskemalla vibraatiospektri, josta voidaan tarkistaa, että minimienergian saavutettavalla geometrialla kaikki lasketut taajuudet ovat reaalityyppisiä, eivätkä sisällä imaginaarisia kertoimia, jotka eivät ole kumoutuneet laskuissa.^{16,85} Jos tulokset kuitenkin sisältävät imaginaarisia taajuuksia, tarkoittaa se sitä, että varsinaisen minimienergian löytämisen sijaan ehdotettu geometria vastaa lokaalia minimiä eri energiatilojen, eli tässä tapauksessa geometrioiden, välisessä satulapistessä ja laskut on suoritettava uudelleen oikean vastauksen saamiseksi.

Rakenteen optimointi on osa molekyylin parametrisointia, eikä se liity siirtymän ennustamiseen käytettyihin laskuihin millään tavalla. Parametrisoinnissa ja ennustuksessa voidaankin vapaasti käyttää eri menetelmiä ilman, että ongelmia kohdattaisiin. Esimerkkinä tästä on tiheysfunktionaalien käyttö optimoinnissa ja *ab initio* laskujen hyödyntäminen siirtymän laskemisessa.⁸⁴ Toinen ennen siirtymään liittyviä laskutoimituksia laskettava tekijä on varjostusvakio

(eng. shielding constant), joka lasketaan jokaiselle molekyylin tutkittavalle ytimelle. Nämä laskut tehdään lähes aina kvanttimekaanisesti esimerkiksi tiheysfunktionaalien tai *ab initio* laskujen avulla.^{12,93}

Ennustusmenetelmistä empiiriset menetelmät ovat sellaisia, jotka täytyy kouluttaa tehtävänsä ennen niiden soveltamista käytäntöön. Koulutus suoritetaan parametrisoimalla tunnetut yhdisteet ja syöttämällä niiden tiedot haluttuun algoritmiin, minkä jälkeen saatuja tuloksia verrataan kyseisten yhdisteiden kokeelliseen dataan. Laskuja ja käytännön tuloksia vertaamalla menetelmää voidaan kehittää esimerkiksi lisäämällä oikeita painotusarvoja, korjaamalla huomioon otettavien tekijöiden laajuutta tai valikoimalla yhdisteen siirtymän laskemiseen paras mahdollinen laskukaava.⁷⁴ Paras tulos koulutuksessa saavutetaan, kun koulutustietokantaan kuuluvat rakenteet niitä vastaavine siirtymineen ovat rakenteellisesti läheistä sukua tutkittaville yhdisteille.⁹⁴ Yleisesti empiiristen menetelmien heikkous onkin niiden käytön rajoittuminen varsin kapeisiin vaihtoehtoihin olosuhteiden suhteen riippuen käytössä olevista vertailukohdista.^{74,95} Lisäksi empiiriset menetelmät eivät juurikaan sovellu esimerkiksi biologisten tai lääketieteellisten tutkimusten käyttöön, joissa suurikokoisten molekyylien toimintaa esimerkiksi ligandeina tai sitoutumista muuten saatettaisiin tutkia laskennallisesti.⁹⁶ Empiirisistä menetelmistä eroten kvanttimekaaniset menetelmät eivät tarvitse kouluttamista, sillä niissä laskut pohjaavat teoreettisen fysiikan mukaisille kaavoille, joiden tueksi ei tarvita kokeellista tietoa.

Kemiallisen siirtymän laskemiseen käytettyjen menetelmien yhteydessä puhutaan toisinaan laskujen niin sanotusta hinnasta. Tällä viitataan laskuihin kuluneeseen aikaan sekä tietokoneelta vaadittuun suorituskykyyn ja yleisesti ohjelmiston vaatimukseen. Mitä korkeampi hinta on, sitä haastavampia laskut ovat ja sitä hitaammin tulokset saadaan. Korkeampi

hinta ei välttämättä tarkoita tarkempia tuloksia, vaan kevennettyjen algoritmien on todettu tarjoavan tietyissä tapauksissa yhtä tarkkoja tai jopa parempia tuloksia kuin liiallisen monimutkaiset ja aikaa vievät laskut.^{15,97,98,99} Tietokoneiden kehityksen myötä menetelmien hintaa ollaan pystytty kuitenkin nostamaan pisteeseen, jossa varsin monimutkaisiakin laskuja voidaan suorittaa järkevässä ajassa, ja näin ollen useiden kaupallisten ohjelmistojen levinneisyys onkin yleistynyt tehokkaampien koneiden yleistyessä.

Erilaisia laskennallisia menetelmiä on verrattu toisiinsa useissa eri tutkimuksissa,¹⁵ mutta yksiselitteisesti ei olla voitu määrittää, onko jokin niistä toisia parempi tai onko laskujen laadun ja algoritmin eri piirteiden välillä edes suoranaista yhteyttä. Esimerkiksi GIAO (Gauge Independent Atomic Orbital) ja CSGT (Continuous Set of Gauge Transformation) menetelmien vertailussa on todettu, ettei laskujen hinta ollut suoraan yhteydessä ennusteen tarkkuuteen, vaan että koesarjan halvimalla ja kalleimmalla menetelmällä oli suunnilleen sama keskimääräinen virhe (0.115 ppm ja 0.112 ppm).¹⁵

Ennusteiden tuloksia voidaan parantaa ottamalla huomioon tarkasti eri parametrit ja kemiallisen siirtymän riippuvuus niistä. Esimerkiksi vetysitoutumisen ja liuotinvaiikutuksen huomioimisella on todettu olevan tuloksia parantava vaikutus.¹⁵ Laskennallisia menetelmiä ja operaattoreja voidaan muokata ja muokataankin tarvittaessa korjauksilla, joiden avulla käytetyt laskut vastaavat paremmin todellisuutta. Tämä tulee tarpeeseen varsinkin kohdemolekyylin koon kasvaessa, jolloin muun muassa erilaisten vuorovaikutusten määrä kasvaa. Samoin korjauksia on tehtävä, kun kohdemolekyylillä sisältää raskaampia atomeja, sillä tällöin käytännön vaikutukset tyypillisesti vahvistuvat ja teoria ei vastaa enää todellisuutta yhtä hyvin kuin pienempien atomien tapauksessa.¹⁰⁰ Suurta osaa laskujen

tarkkuudessa määrittelee käytettyjen kantajoukkojen määrä sekä ohjelmiston oikein kouluttaminen, mutta olennaista on myös ottaa huomioon aikaisemmin esiteltyjen parametrien vaikutus siirtymään. Jos esimerkiksi tautomeriaa ja siitä mahdollisesti johtuvaa intramolekulaarista vetysitoutumista sekä tämän johdosta lämpötila-, konsentraatio- ja pH-riippuvuutta ei oteta laskuissa huomioon, ei suurillakaan kantajoukkovalikoimilla saavuteta tyydyttäviä tuloksia.²¹

7.2. Empiiriset menetelmät

7.2.1. Tietokantojen käyttö

Tietokantoja voidaan käyttää kohdeyhdisteen kokeellisen spektrin etsimiseen ja sen hyödyntämiseen, mutta tapauksissa, joissa haluttuja spektrejä oikeissa olosuhteissa ei ole saatavilla, voidaan spektri simuloida laskennallisesti tietokantojen pohjalta. Luonnollisestikin luotettava tietokantoihin pohjaava ennuste nojaa siihen, että tutkittavaa yhdistettä vastaavien rakenteiden kemiallisia siirtymiä on tutkittu ja että nämä tiedot ovat saatavissa. Ennuste tuotetaan esimerkiksi yksinkertaisimmillaan etsimällä tietokannasta kutakin yhdisteen atomia parhaiten vastaava osuma, minkä jälkeen nämä ennusteet yhdistetään.^{74,75,83} Tämän perusteella voidaan sanoa, että tietokantahaut ovat tilastollinen tapa simuloida spektrejä. Jos tutkitun yhdisteen spektri on valmiiksi tietokannassa, voidaan haku suorittaa esimerkiksi yhdisteen nimellä tai rakennekaavalla,¹⁰¹ mutta sen puuttuessa voidaan spektri simuloida atomi kerrallaan tietokannan perusteella.

Jos suoraa vastaavuutta yhdisteen spektrille ei ole saatavissa, voidaan siirtymät laskea etsimällä algoritmien avulla tietokannasta tutkittua ydintä parhaiten kemialliselta ympäristöltään vastaava osuma ja laajentamalla hakua sidos kerrallaan kauemmas tutkitusta ytimestä poissulkien huonoimmat vastaavuudet.⁹⁵ Kun paras vastaavuus on saavutettu, toistetaan prosessi muiden tutkitun yhdisteen ydinten kohdalla ja nämä ennusteet kootaan spektriksi.^{74,75,86,94} Yksi tällä tapaa toimivista algoritmeista on nimeltään HOSE-koodi (Hierarchical Organization of Spherical Environments), jota käytetään suhteellisen yleisesti tietokantahakujen yhteydessä.^{76,102,78}

HOSE-koodilla ytimen kemiallista ympäristöä kuvataan jakamalla tutkittavaa ydintä ympäröivä rakenne renkaiden muotoisiin alueisiin, jotka kuvaavat siirtymään vaikuttavaa painoarvoa kunkin atomin kohdalla. Kullakin alueella ympäröivät atomit jaetaan ennalta määrättyihin luokkiin, joiden pohjalta ne saavat arvot, joita laskentamalli kykenee käsittelemään. Jaottelu tehdään tyypillisesti muun muassa hybridisoitumiseen ja hapetusasteeseen perustuen sen lisäksi, että tyypilliset atomit, kuten hiili, vety, typpi ja happi, erotellaan erikoisemmista alkuaineista, kuten seleeni tai arseeni.¹⁰³ Prosessin aikana ytimien siirtymiä kuvataan todennäköisellä välillä, joka laskujen edetessä supistetaan tarkemmin siirtymän arvioimiseksi.⁸⁶ Samalla erilaisille rakenteellisille tekijöille annetaan painotusarvot sen mukaan, kuinka paljon niiden oletetaan vaikuttavan tutkittavan ytimen varjostukseen. Painotusten optimointi tehdään tietokantahaun koulutuksen yhteydessä.

Varhaiset versiot tietokantahauista käsittelivät rakenteita vain kaksiulotteisina, mutta sittemmin ennustustulosta on parannettu laajentamalla tietokantoihin kirjattuja rakenteita kolmiulotteisiksi ja painottamalla hauissa tutkitun yhdisteen kanssa saman stereorakenteen

omaavia vertauskohtia. Tällä tavoin molekyylin todellisen rakenteen vaikutus siirtymään on kyetty ottamaan paremmin huomioon ja ennusteen tarkkuutta on voitu parantamaan.⁷⁵

Vaikka tietokantojen käytön etuna on mahdollisuus ennustaa varsin laaja-alaisesti erilaisten atomien kemiallisia siirtymiä, on sen ongelmana sen riippuvuus sopivien referenssiatomien olemassaolosta. Keskimäärin tietokantoihin perustuvat ennusteet eivät ole yhtä tarkkoja kuin muiden laskennallisten mallien avulla tuotetut spektrit, koska ne ovat vain niin tarkkoja kuin tietokannan laajuus sallii.⁷⁴ Ongelmaksi tietokantahauissa muiden laskennallisten menetelmien tavoin saattaa osoittautua myös laskujen hinta. Ongelma on nykyäänkin ajankohtainen, sillä tietokoneiden kehittyessä ja tehostuessa myös laskujen vaatimustasot ja monimutkaisuus lisääntyvät. Lisäksi paremman ennusteen saamiseksi tietokannan tulisi olla laaja, mutta tämä saattaa suurten tietokantojen tapauksessa johtaa ongelmiin tilan riittämisen ja laskujen vaikeutumisen suhteen. Lisäksi laaja vertailukanta lisää laskuihin kulunutta aikaa.

Tietokantaennusteissa ongelmia voivat aiheuttaa virheet kannassa, jos identtisillä rakenteilla on kaksi erilaista spektriä. Suurten kantojen yhteydessä todennäköisyys painovirheiden ja muuten tietokantoihin eksyneen virheellisen datan olemassaololle kasvaa,⁹⁴ mutta tämä ongelma on kuitenkin todettu olevan helppo korjata ristivertailulla. Parhaimmillaan laskennalliset menetelmät ovat nopea ja helppo tapa ennustaa yhdisteen spektri, mutta jos laskumenetelmän ja laskuja suorittavan koneen yhdistelmä valitaan huonosti, voivat laskut viedä tarpeettoman kauan tuottamatta edes varsin osuvia ennusteita.¹⁰¹

Esimerkkinä tietokantaennusteesta on Schweitzerin ja Smallin toteuttama tutkimus, jossa pohjana käytettiin Sadtler ^{13}C NMR kirjastoa, joka sisälsi tutkimuksen aikaan 29 966 rakennetta sekä niihin liittyvät kemialliset siirtymät. Näistä rakenteista valittiin 21 199, joita käytettiin tutkimuksessa hyödyksi. Valikoidut yhdisteet sisälsivät vain C, H, O, N, P, S, F, Cl, Br ja I:a, joita käytetty algoritmi tuki. Tutkittavana oli sekä alifaattisia että aromaattisia yhdisteitä, joskin aromaattiset yhdisteet rajoittuivat yksinomaan bentseenirenkaan sisältäviin yhdisteisiin, eikä esimerkiksi furaanien tai pyridiinien kaltaisia rakenteita tutkittu ollenkaan. Jotta geometriset tekijät voitiin ottaa huomioon, muutettiin rakenteet kaksiulotteisista kolmiulotteisiksi ja ympäristöä kuvaavina tekijöinä käytettiin vektoreita.⁷⁴ Tutkimuksessa huomioon otettuja parametreja olivat esimerkiksi substituentit ja niiden sijainti bentseenirenkaassa, molekyylin geometria ja sidospituus, atomien euklidinen etäisyys toisistaan. Tutkimuksessa testattiin algoritmia erilaisilla ympäristöä kuvaavilla parametreilla ja niiden kokoonpanoilla. Käytetyillä menetelmillä voitiin selvittää kohdeyhdisteiden kemialliset siirtymät, mutta signaalien intensiteettiä tai piikkien leveyttä ei kyetty kyseisillä menetelmillä ennakoimaan.⁷⁴

7.2.2. Inkrementaaliset menetelmät

Inkrementaalsiin menetelmiin perustuvat laskutavat ovat perinteinen ja yleinen tapa ennustaa kemiallisia siirtymiä. Niitä käytetäänkin osana kaupallisia ohjelmapaketteja, kuten ChemOffice, MestReNova ja ACD, kun halutaan simuloida NMR-spektri,^{12,15,33} joskin näissä ohjelmistoissa yhdistellään yleistyvässä määrin puhtaan inkrementaalisia menetelmiä myös muiden laskennallisten menetelmien, kuten neuroniverkkojen, tietokantahakujen ja kvanttimekaanisten laskujen, kanssa. Keskimäärin puhtaasti inkrementaalisilla menetelmillä siirtymät voidaan ennustaa hyvällä tarkkuudella, jos kyseessä on tunnettu yhdiste, jonka rakenne ei poikkea suuresti ohjelmaan valittujen parametrien arvoista.^{12,15}

Mallinnukseen perustuvat ennustusteet tukeutuvat erilaisiin laskennallisiin menetelmiin, jotka kuvaavat yhdisteen rakenteen ja kemiallisen siirtymän yhteyttä. Voidaan sanoa, että inkrementaaliset menetelmät ovat additiivisia, sillä usein nämä mallit ovat monien erilaisten kertoimilla painotettujen termien summia:^{75,17,95}

$$(31) \quad \delta_a = b_0 + b_1x_1 + \cdots + b_nx_n$$

Yhtälössä (31) δ_a on ytimen a kemiallinen siirtymä, x_i kuvaa erilaisia kuvaajia ja b_i on kunkin kuvaajan painotusarvo.⁹⁵ Yhtälössä esiintyvät termit x ovat erilaisia algoritmeja, jotka kuvaavat siirtymän suhdetta lukuisiin tekijöihin, kuten molekyylin rakenteellisiin, topologisiin ja elektronisiin ominaisuuksiin sekä molekyylin geometriaan ja vaihtoehtoisia molekulaarisia kuvaajia tähän tarkoitukseen on olemassa useita satoja.⁹⁵

Inkrementaalisten menetelmien kehityksen alkuaikoina inkrementit kerättiin pääasiassa monosubstituoiduista yhdisteitä,¹⁰⁴ mikä luonnollisestikin aiheutti tuloksiin virhettä, mutta nykyään pohjana käytettyjen yhdisteiden kirjo on laajempi ja näin ollen ennustuksen tarkkuus parempi.^{17,74,105}

Yleensä ottaen termit voidaan jakaa kahteen luokkaan; i) staattisiin tekijöihin sekä ii) konformationaaliin ja stereokemiallisiin ominaisuuksiin. Näistä luokista jälkimmäiseen kuuluvat tekijät kuvaavat muuttujien liikkeen keskiarvoa avaruudessa ja niiksi lasketaan esimerkiksi Coulombiset vuorovaikutukset ja Van Der Waalsin voimat sekä sidos- ja rengasanisotropia. Staattisiin kuvaajiin puolestaan kuuluvat esimerkiksi ”atomivaraus” (eng. atomic charge), joka voidaan laskea Lewis-Langmuir ja Gasteiger–Marsili varausten pohjalta, ja substituenttien vaikutus.¹⁷

Jos kuvaajat ovat molekyylille tiedossa, voidaan niitä käyttää parhaiten laskuihin sopivan rakenteen ja yhdisteen ominaisuuksien yhteyttä kuvaavan mallin löytämiseksi.¹⁰⁵ Tämän jälkeen tutkittua yhdistettä voidaan verrata olemassa olevaan tietokantaan ennusteen tekemiseksi.¹² Kaikkia termejä ei välttämättä käytetä laskuissa, jos niiden tarjoama informaatio on liian mitätöntä vaikuttaakseen oleellisesti kemialliseen siirtymään. Tyypillisesti tämä tarkoittaa, että termi on arvoltaan hyvin pieni tai nolla.¹⁰⁵

Inkrementaaliset menetelmät koulutetaan tehtävänsä koneiden oppimistekniikoiden avulla samaan tapaan kuin muutkin empiiriset menetelmät. Tällöin lopullisen algoritmin luotettavuus riippuu suurilta osin siitä, kuinka laaja ja tarkka koulutukseen käytetty tietokanta on ollut.^{75,76,12,17} Yleisesti ennustus perustuukin siihen, että ytimen

ympäristöä tutkitaan algoritmien avulla ja vastaavia siirtymiä etsitään tietokannasta parhaan simulaatiospektrin kasaamiseksi. Jos tietokanta ei sisällä tutkitun yhdisteen ytimiä vastaavia spektrejä, ei myöskään tuloksena saatu ennustus tule olemaan kovin tarkka.³³ Onkin huomattava, että jotta laskennalliset menetelmät olisivat käyttökelpoisia, tulisi esimerkiksi ¹³C-ennusteiden osua parin ppm:n tarkkuudella oikeaan yhdisteen ollessa liuoksessa, joka sisältää useita funktionaalisia ryhmiä ja konformaationaalisia muuttujia.¹⁰⁶ Protonien siirtymien tapauksessa ennusteen ja kokeellisen tuloksen välisen eron ei tulisi olla suurempi kuin 0,25 ppm.¹⁷

Inkrementaalisten menetelmien etuna on menetelmän tarkkuus tietokantahakuihin verrattuna. Tämä perustuu mahdollisuuteen interpoloida saatuja tuloksia.^{74,95} Laskuja voidaan muokata laajemmalle kohdekannalle sopivaksi, mutta tällöin tulosten tarkkuus kärsii, jos laskuihin kuluva aika ja teho halutaan pitää järkevänä.¹⁰⁴ Lisäksi varsinkin varhaisempien inkrementaalisten menetelmien ongelmana oli niiden kyvyttömyys erottaa stereoisomeereja toisistaan.^{12,33} Inkrementaalisia menetelmiä voidaan myös yhdistää tietokantahakujen kanssa, jolloin tilastollisin ja inkrementaalisin menetelmin lasketut spektrit yhdistetään niin sanotuksi hybridispektriiksi. Tällöin spektrin siirtymät ovat näiden kahden menetelmän keskiarvoja ja niiden luotettavuutta on syytä kuvata luotettavuuskertoimella, joka kertoo, kuinka lähellä toisiaan ennusteet kunkin siirtymän kohdalla olivat. Luotettavuuskerroin on korkea, jos siirtymien ero on pieni, sillä silloin menetelmät todistavat toisensa oikeiksi, mutta eron ollessa suuri on luotettavuuskerroin pieni ja ainakin toinen tuloksista todennäköisesti väärin.⁹⁴

Inkrementaalisia menetelmiä on käytetty muun muassa hiilihydraattikemiassa erityisesti ^{13}C NMR spektrien simuloimiseen ja niille on todettu sopivan CSGS-menetelmän, joka toimii loistavasti sakkarideille ja glykokonjugaateille. Aikaisemmin sen ongelmina muihin empiirisiin menetelmiin verrattuna ovat kuitenkin olleet heikko suorituskkyky ja optimoimattomat algoritmit ja kykenemättömyys tuottaa ^1H NMR ennusteita vertailukohteenä käytetystä laajasta spektritietokannasta huolimatta.⁷⁸ Myöhemmissä tutkimuksissa CSGS:a on kuitenkin kehitelty enemmän ja sen sopivuutta ^1H -spektrien ennustamiseen on tutkittu algoritmia hienosäätämällä sekä suorittamalla ennusteita rajoittamattomilla pH-, liuotin- ja lämpötilaparametreilla. Näillä korjauksilla ohjelmiston ennusteilla on saavutettu muihin empiirisiin metodeihin verrattavissa oleva tarkkuus sekä nopea laskuteho, vaikka vaativimmilla asetuksilla laskuihin kulunut aika saattoi olla jopa 5-10 minuuttia.⁷⁸

Inkrementaalisilla metodeilla on tutkittu monia muitakin NMR-aktiivisia ytimiä kuin vain ^1H ja ^{13}C :tä. Esimerkiksi ^{19}F ytimien siirtymiä varten on kehitetty uusia laskumenetelmiä, jotka on optimoitu kyseiselle ytimelle.¹⁰⁵

7.2.3. Neuroniverkot ja geneettiset algoritmit

Tietokantahaut ja inkrementaaliset menetelmät ovat laskuina lineaarisia, sillä vaikka niissä eri tekijöitä painotetaan sopivilla kertoimilla, lasketaan haluttu lasku tehtävään tarkoin valitulla funktiolla, joka on luotu täsmällisen vastauksen saamiseksi. Vaihtoehtona lineaarisille laskuille voidaan käyttää myös epälineaarisia laskuja, joiden rakenne muistuttaa enemmänkin verkkoa, johon data syötetään. Oikein koulutettu epälineaarinen malli voi toteuttaa laskut ilman, että se vaatii täsmällisen funktion syöttämistä.¹⁰⁷ Käytetyin epälineaariin menetelmiin lukeutuva tekniikka on neuroniverkkojen soveltaminen. Neuroniverkot ovat suhteellisen uusi lisä siirtymien ennustukseen sekä datan käsittelyyn kemiassa yleensä ottaen, sillä vielä noin kaksikymmentä vuotta sitten neuroniverkot olivat sen verran uusi menetelmä, ettei niitä oltu juurikaan kehitetty tehokkaiksi, eikä niiden teoreettinen pohja ollut kovin selkeä.¹⁰⁸ Sen jälkeen niiden parissa on kuitenkin tehty tutkimusta ja niihin pohjautuvia sovelluksia on kehitetty lukuisia.^{109,110} Neuroniverkkojen kehitys oli jo tutkimusten alkuvaiheessa suhteellisen nopeaa, sillä alle vuosikymmen tutkimuksen alkamisen jälkeen niiden todettiin olevan menetelmänä osuva ja nopea ennusteiden tekemiseen.¹¹⁰

Neuroniverkkoja on yksinkertaisinta kuvata joukkona funktioita, joista jokaisella on oma tehtävänsä ja jotka on asetettu ryhmissä tietynlaiseen arvojärjestykseen, eräänlaisiin verkon kerroksiin, joista järjestyksessä myöhemmin tulevat funktiot saavat muuttujansa edellisen kerroksen funktioilta. Kunkin funktion arvoja painotetaan eri kertoimilla, jotta mahdollisimman tarkka tulos saavutettaisiin.¹⁰⁹ Tällä tavalla kyetään optimoimaan epälineaariset riippuvuudet, jotka vaikuttavat tulokseen. Neuroniverkkojen kyky löytää epälineaarisia suhteita rakenteen ja ominaisuuksien välillä onkin yksi sen suurimmista eduista.

Esimerkiksi asyklisten alkeiden kaksoissidokseen nähden α -asemassa sijaitsevan hiilen kemiallisen siirtymän laskemiseen neuroniverkkojen on todettu olevan tehokkaampia kuin suoraa syy-seuraussuhdetta tutkivien mallien. Molekyylin ominaisuuksia voidaan osaltaan tutkia tällä ennustetekniikalla vertailemalla saatujen ennusteiden paremmuutta lineaarisesti laskettuihin ennustustehisiin. Jos lineaarinen malli tarjoaa neuroniverkkoa runsaammin kokeellisesta datasta poikkeavia ennusteita, on todennäköistä, että yhdiste sisältää epälineaarisia rakenne-ominaisuus suhteita.⁷⁷ Nimensä neuroniverkot saavat siitä, että kukin funktio edustaa menetelmässä yhtä hermosolua, eli neuronia, funktioiden muodostamassa keinotekoisessa hermosoluverkossa.^{75,107}

Neuroniverkkoja on monia erilaisia,¹⁰⁹ mutta niistä jokaisessa ensimmäinen kerros muodostuu funktioista, jotka yksinkertaisesti keräävät informaatiota ilman laskutoimituksia. Funktioille voidaan syöttää rakenteellisia parametreja erilaisin tavoin, jotka muuttavat informaation numeroiksi. Tämä voidaan tehdä esimerkiksi inkrementailla tai tietokantahakuun kehitetyllä ohjelmistolla (esim. HOSE). Data kulkeutuu neuroniverkon lävitse, kunnes saavutetaan viimeinen kerros, joka tässä tapauksessa antaa lopullisen ennusteen.⁷⁵ Tyypillisesti neuroniverkko koostuukin vähintään kolmesta kerroksesta, joista yksi on niin sanottu piilokerros. Se sijaitsee datan syöttämiseen tarkoitetun ja tulokset antavan kerroksen välissä, jossa laskuja suoritetaan datan saamiseksi uloimman kerroksen vaatimaan muotoon. Piilokerroksia voi olla verkossa useita ja niiden määrä riippuu verkon käyttötarkoituksesta sekä toimitettavan tehtävän monimutkaisuudesta.

Ensimmäisen kerroksen informaationkeräyksessä voidaan käyttää esimerkiksi järjestys- ja kuvailusääntöjä, joista järjestyssäännöillä tutkittavan ytimen kemiallinen ympäristö huomioidaan muuttamalla se

erilaisiksi muuttujiksi. Samalla eri tekijöille annetaan sopivat painoarvot laskuihin. Kuvailusäännöillä näitä muuttujia voidaan sitten istuttaa ennalta syötettyihin lausekkeisiin, jotka syöttävät datan eteenpäin seuraavaan kerrokseen. Kun tutkailtavaa ydintä ja sen ympäristöä kuvaillaan näin numeerisin tavoin, voidaan tarpeelliset laskut suorittaa ongelmitta.^{107,111}

Valvotussa koulutuksessa sekä verkkoon syötettävää dataa, että vertailutuloksia kuvaillaan muuttujilla, jolloin tuloksia ei käytetä pelkästään arvioimaan menetelmän tarkkuutta, vaan ne myös vaikuttavat painotuskertoimien muokkaamiseen. Jos neuroniverkon koulutus keskittyy jonkin jo valmiiksi suhteellisen tarkan menetelmän hienosäätöön tai viimeistelyyn, voidaan koulutus tehdä myös valvomatta, jolloin verkkoon syötettävälle datalle annetaan jotkin alkumallit laskuihin, jotka muutaman iteroinnin jälkeen tasautuvat tarkimpaan mahdolliseen vaihtoehtoon.¹⁰⁹

Neuroniverkkojen etuja ovat niiden kyky opettaa itseään käytön seurauksena ja mahdollisuus laskea tuloksia ilman täydellistä ymmärrystä riippuvuuksien syistä.¹¹² Ennen käytännön sovelluksia uusi neuroniverkko tulisi kouluttaa vertailudatalla tunnetuista rakenteista ja niihin liittyvistä siirtymistä, jotta funktioiden painotuskertoimet voitaisiin optimoida.^{109,103} Kuten funktioiden koulutuksessa muidenkin menetelmien tapauksessa, paras tulos saadaan, kun koulutus suoritetaan kohdeyhdistettä läheisesti rakenteellisesti muistuttavilla yhdisteillä.^{75,77} Tyypillisesti suurimmat erot käytännön datan ja laskennallisten tulosten välillä selittyvät koulutussetin puutoksista.¹¹¹ Koulutusta jatketaan, kunnes ero kokeellisen datan ja ennusteen välillä on tarpeeksi pieni.⁷⁷

Neuroniverkkojen yksi hyödyllisimmistä piirteistä on se, että ne sopivat loistavasti molekyylin yleisten ominaisuuksien yhdistämiseen muuhun dataan. Tästä esimerkkinä voidaan pitää sitä, että neuroniverkot sopivat rakenteen ja ominaisuuksien (quantitative structure-property relationship, QSPR) välisiin kytköksiin liittyvien ongelmien ratkomiseen lineaarisia malleja paremmin. Osittain tästä syystä neuroniverkot ovatkin hyödyllisiä tuntemattoman rakenteen löytämiseen NMR-datan perusteella.^{109,110} Ongelmana neuroniverkkojen käytössä puolestaan voi olla se, että ne ovat erityisen herkkiä muutoksille vertailutietokannassa ja saattavat uuden informaation myötä laskea huonosti kokeelliseen dataan korreloivia siirtymiä ytimille. Tämä on kuitenkin helposti ratkaistavissa, sillä neuroniverkkojen laskuja pystytään säätämään niin, että uuden datan aiheuttaman virheen määrä vähenee ja saadaan laajemmin paikkansapitävä malli ilman laskujen jäämistä toistuviin malleihin.⁷⁷

Eräs neuroniverkkojen sovellus on geneettinen algoritmi, jota voidaan käyttää suurten lähtötietokantojen ongelmiin. Geneettisiä algoritmeja voidaan käyttää esimerkiksi sopivan rakenteen löytämiseksi yhdisteelle, jonka fysikaalisia ominaisuuksia tiedetään. Ne toimivat samaan tapaan kuin neuroniverkot valikoimalla sopivan rakenteen ja tuottamalla sukupolvi toisensa perään ehdotuksia sopivimmasta rakenteesta karsien joukosta ne jälkeläiset, jotka eivät täytä vaatimuksia. Tämä tehdään soveltamalla tarkoitukseen luotuja funktioita, jotka arvioivat ehdotuksen sopivuuden, jolloin algoritmi mutatoituu ja rakenne tarkentuu laskujen edetessä. Rakenteen selvittämisen jälkeen neuroniverkkoja voidaan käyttää yhdisteen siirtymien ennustamiseksi ja spektrin simuloimiseksi.^{88,109} Geneettisiä algoritmeja voidaan myös soveltaa, jos halutaan luoda karkeampi malli. Tällöin parhaiten tilanteita mallintavat kuvaajat ja funktiot voidaan valita geneettisten algoritmien avulla.¹¹¹

Neuroniverkkojen on todettu olevan esimerkiksi multilineaarista regressiomallia tarkempi ja nopeampi siirtymien ennustuksessa,¹¹² vaikka useimmissa tapauksissa yksinkertaisempien mallien käyttäminenkin ei tarjoa huonoja, vaan lähes yhtä tarkkoja, tuloksia kuin neuroniverkot.¹⁰³

7.3. Kvanttimekaaniset menetelmät

7.3.1. Yleistä

Empiiristen kaavojen käyttö siirtymien laskemiseen voi muodostua turhan haastavaksi, jos halutaan tarkkoja tuloksia, sillä muuttujien määrän kasvaessa kaavat muuttuvat monimutkaisemmiksi,¹¹³ eivätkä ne aina silloinkaan vastaa täysin todellisuutta. Joissain tapauksissa kvanttimekaanisten menetelmien käyttö ei ole pelkästään suositeltavaa, vaan jopa pakollista tulosten saamiseksi, sillä toisinaan empiiriset ja semi-empiiriset laskut eivät riitä antamaan tarpeeksi tarkkoja tuloksia. Tällaisia tapauksia voivat olla esimerkiksi kompleksit, joissa muuttujien määrä kasvaa laajemmaksi kuin tarjolla olevien sopivien empiiristen kaavojen määrä.^{75,16} Kvanttimekaanisia laskuja käyttäviä ohjelmistoja on tarjolla laaja valikoima, joista esimerkkeinä ovat Gaussian 09, CADPAC ja Quantum Espresso.¹⁰²

Kvanttimekaaniset menetelmät ovat joukko laskuja, joissa hiukkasen aaltofunktiota ja siihen liittyvää energiaa kuvaava Schrödingerin yhtälö (Yhtälö (32)) pyritään ratkaisemaan erilaisin keinoin.

$$(32) \quad \hat{H}\Psi_i = E_i\Psi_i$$

Tyypillisesti laskuja helpottamaan käytetään Hamiltonin operaattoria, jonka avulla kuvataan systeemin kokonaisenergiaa ja jolla Schrödingerin yhtälö saadaan yksinkertaisempaan muotoon. Operaattoria tarvitaan, koska yleisesti se on tunnettu, toisin kuin hiukkasen aaltofunktio ja sitä vastaava energia. Yhtälössä (32) \hat{H} on Hamiltonin operaattori, Ψ_i on systeemiä vastaava aaltofunktio ja E_i aaltofunktiota vastaava energia.

Käytettyjen keinojen pohjalta kvanttimekaaniset laskut voidaan jakaa *ab initio* ja tiheysfunktionaaliteoria (DFT) -menetelmiin.^{75,92,114} Koko systeemiä, eli sekä ydintä että elektroneja, kuvaava operaattori on Hamiltonin operaattori, mutta usein se yksinkertaistetaan laskuissa elektroniseksi Hamiltonin operaattoriksi, jossa ytimen liikkeen oletetaan olevan niin hidasta elektronin liikkeeseen verrattuna, että vain elektronin energia ja sen muutos otetaan huomioon laskuissa.

Kvanttimekaanisten menetelmien jako ei ole aivan yksiselitteinen, sillä toisinaan DFT määritellään *ab initio*-menetelmäksi ja toisinaan ei. Tämä johtuu siitä, että *ab initio* määritelmästä riippuu, lasketaanko tiheysfunktionaalilaskut sen piiriin vai ei. Tätä kirjallisuuskatsausta varten *ab initio* on määritelty aaltofunktioteorialle perustuviksi laskuiksi, eikä vain yleisemmin fysiikalle perustuvaksi menetelmäksi, joten tiheysfunktionaaliteorian laskuihin pohjautuvat menetelmät jakautuvat omaan haaraansa. Toisaalta nämäkin sekoittuvat ns. hybridifunktioissa, joista kerrotaan lisää myöhemmin, ja menetelmiä yhdistellään tutkimuksissa ennusteiden eri osien laskemiseksi, jotta ennusteen tekeminen ja tarkkuus tehostuisi.

Lisäksi mainittakoon, että vaikka *ab initio*- ja DFT-laskuja käytetään itsenäisesti, on myös varsin yleistä hyödyntää molempiin perustuvia keinoja jossain vaiheessa ennusteen tekemistä täydentämällä tekniikoilla toisiaan. Tämän vuoksi menetelmien vertailu toisiinsa ei aina ole mielekäästä, vaikka puhtaasti *ab initio*on tai DFT:hen perustuvien menetelmien tuloksia onkin toisinaan vertailtu.

Monimutkaisten yhdisteiden tutkinnan yleistyessä kvanttimekaaniset laskumenetelmät ovat vallanneet alaa siirtymien ennustamisessa viime vuosina, kun perinteisemmät laskumenetelmät eivät ole enää tarjonneet tyydyttäviä tuloksia. Aikaisemmin niiden käyttöä rajoitti laskujen vaativuus,¹⁷ joka kulutti huomattavasti aikaa ennusteiden tekemiseksi, mutta tietokoneiden kehitys ja tehostuminen ovat mahdollistaneet kasvavassa määrin näiden menetelmien käytön.^{75,33} Hyvänä esimerkkinä tästä voidaan pitää GIAO-menetelmää, jota aikaisemmin pidettiin liian kalliina ja haastavana, mutta joka nykyään on yksi yleisimmistä kvanttimekaanisista kemiallisen siirtymän ennustamiseen käytetyistä tavoista. Nykyään sen suosiota selittää juuri se, että sen laskut mielletään halvoiksi useisiin muihin menetelmiin verrattuna ja että sillä saadaan näin suhteellisen tarkkoja tuloksia nopeasti ja helposti.¹¹⁵

Tutkimuksen alkuvaiheessa kvanttimekaaniset ennusteet olivat lähinnä suuntaa-antavia esimerkiksi rakenteellisesti toisiaan läheisesti muistuttaville isomeereille.⁸⁶ Toisaalta vielä nykyäänkin kvanttimekaanisten laskujen ongelmana on niiden soveltuminen vain pienille ja keskikokoisille molekyyleille, koska mahdollisten konformaatioiden määrä, ja näin ollen myös laskujen monimutkaisuus ja aikaakuluttavuus, kasvaa molekyylin koon kasvaessa.^{17,92} Kvanttimekaanisten menetelmien on kuitenkin todettu olevan useimmissa tapauksissa esimerkiksi inkrementaalisia menetelmiä tarkempia.¹²

Kvanttimekaaniset laskut perustuvat niin sanotuille kantajoukoille (eng. basis sets), joiden pohjalta algoritmit kykenevät suorittamaan niiltä vaaditut laskut. Kantajoukot ovat funktioita, joilla kuvataan elektronista aaltofunktiota laskuissa. Käytännössä tämä tarkoittaa, että ne ovat funktioita, joita yhdistelemällä voidaan kuvata molekyyliorbitaaleja ja ne ovatkin tyypillisesti atomiorbitaaleja, vaikka teoriassa ne voivat olla mitä tahansa funktioita.³³ Kantajoukkovalikoimaan on sisällytettävä atomiorbitaalia kuvaavien funktioiden lisäksi myös muita termejä, kuten polarisoituvuutta kuvaavia funktioita, jotta tulokset vastaisivat tarkasti todellisia siirtymän arvoja.¹¹⁶ Jotta vähimmäisvaatimus ennusteen tarkkuuden suhteen täyttyisi, on laskuissa käytettävä vähintään kolmea erillistä kantajoukkoa.¹¹⁷

Kantajoukkojen määrällä voi olla suurikin vaikutus funktion suorituskyykyyn ja näin ollen tarkkuuteen, joten yleisesti paikkansa pitää se, että mitä enemmän kantajoukkoja, sitä paremmin ennusteet vastaavat kokeellisia arvoja.³³ Toisaalta, vaikka laskuissa on mahdollista käyttää teoriassa rajattomasti kantajoukkoja, niin on myös todettu, että siirtymien laskemiseen ei välttämättä tarvita yleisesti käytettyjä laajoja kantajoukkovalikoimia, vaan että pienemmätkin joukot tarjoavat yhtä osuvia tuloksia pienemmässä laskuajassa kuin suurten kantojen perusteella suoritettut laskut.^{15,97,98,99,102} Aikaisemmin laskujen keventämiseksi saatettiin käyttää esimerkiksi painotettuja kantajoukkovalikoimia, joissa molekyylin ytimiä kuvattiin eri tarkkuudella ja näin ollen niitä otettiin huomioon eri painotuksilla. Tällöin laajojakin kantoja pystyttiin käyttämään ilman laskuajan huomattavaa pitenemistä. Tavalla oli kannatuksensa ja vastustuksensa, sillä se ei ollut yleisesti kaikkien mielestä toimiva, vaan jotkut vastustivat sitä vedoten tulosten epätarkkuuteen.¹¹⁷

7.3.2. Tiheysfunktionaaliteoria-laskut

Tiheysfunktionaaliteoriassa Schrödingerin yhtälö (Yhtälö (32)) ratkaistaan erilaisten funktioiden avulla käyttämällä samalla Born-Oppenheimer -approksimaatiota, jonka mukaan tutkittavat kappaleet ovat staattisessa tilassa, eikä systeemin muutos ole huomattava. Tällöin staattiset kappaleet eivät vaikuta lopputulokseen ja laskuissa voidaan ottaa huomioon vain halutut systeemin osat. Vaihtoehtoisesti approksimaatio voidaan ilmaista niin, että elektronien massa on pieni ytimen massaan verrattuna, joten ne mukautuvat ytimen liikkeeseen välittömästi, eivätkä näin ollen vaikuta ytimen liikkeisiin. DFT-laskuissa aaltofunktioille annetaan usein niitä kuvaava funktio, jonka avulla laskut yksinkertaistuvat ja aaltofunktioiden käsittely helpottuu. Teoria saa nimensä siitä, että aaltofunktio, jota kuvaavaa funktiota käytetään laskuissa, kuvaa tutkitun hiukkasen elektronitiheyttä.

Tiheysfunktionaaleja, eli funktioita sisältäviä funktioita, voidaan rakentaa erilaisia ja esimerkiksi niiden osien painotusta laskuissa, kuten vaihtokorrelaatiofunktionaalien (XC-funktionaalien) painoa tai lokaalien funktioiden merkitystä, voidaan säädellä tarpeen mukaan tutkituille yhdisteille paremmin sopivaksi.¹¹⁸ Näin ollen tiheysfunktionaaliteorialle pohjautuvia menetelmiä on laaja kirjo, jotka eritellään tyypillisesti toisistaan sen perusteella, mitä XC-funktionaalia laskuissa käytetään. Useimmat menetelmät eivät ole yleensä herkkiä kyseisen funktion muutoksen suhteen, ja muistuttavatkin siksi paljolti tuloksiltaan toisiaan. Ainoastaan lokaalitiheysapproksimaatiossa (eng. Local Density Approximation, LDA) vaikutus on huomattavissa.¹⁰²

XC-funktionaalit ovat niin sanotusti ei-lokaaleja funktioita ja niillä otetaan huomioon elektronien vaihto ja niiden vaikutus toisiinsa kvanttimekaanisesta näkökulmasta, jotta tiheysfunktionaalilaskut voidaan suorittaa. Vaihto-korrelaatiofunktionaalit jaetaan kolmeen luokkaan: i) lokaalitiheysapproksimaatioon, ii) yleistettyyn gradientti-approksimaatioon (eng. Generalized Gradient Approximation, GGA) ja iii) hybridifunktioihin (esim. MPW1K, B3LYP),¹¹⁸ joissa hyödynnetään *ab initio* -menetelmissä käytettyjä Hartree-fock (HF) laskuja,^{118,119,116} joita voidaan yhdistää lokaaleihin funktioihin adiabaattisen liittymisteorian (eng. adiabatic connection theory) avulla. Vaihto-korrelaatiofunktionaalien käyttö on yksi DFT-menetelmän eduista *ab initio*on verrattuna, koska niiden myötä elektronien korrelaatio otetaan aina huomioon, eikä sitä tarvitse erikseen sisällyttää laskuihin, kuten esimerkiksi Hartree-Fock menetelmässä täytyy tehdä.¹¹⁶

DFT- laskujen kehitystä voidaan kuvailla eri sukupolvissa, joita nimitetään käytetyn XC-funktionaalin mukaan, mutta joista kolmea ensimmäistä nimitetään yleisesti lokaaleiksi funktioiksi. Nimi tulee siitä, että laskuissa otetaan huomioon vain tarkasteltavan ytimen oma sekä sen lähiympäristön elektronitiheys ja kineettinen energia. Ensimmäisen sukupolven DFT-laskuja kutsutaan nimellä lokaali spintiheysapproksimaatio (eng. local spin density approximation, LSDA), jonka tiheysfunktionaalilaskuissa otetaan huomioon ainoastaan ylös- ja alas spintilat ($\pm 1/2$). Ensimmäisen sukupolven laskut antavat suhteellisen hyviä tuloksia kiinteille aineille, mutta nestemäisiä näytteitä mallintaessa on syytä valita jokin toinen lähestymistapa. LSDA:n ongelmaksi nestemäisten laskujen tapauksessa muodostuu konformaatioiden huomioonottaminen, sillä siinä sidosten oletetaan olevan todellista jäykempiä, energiavallien suuruus aliarvioidaan ja sidosenergioita korostetaan liikaa todenmukaisen tuloksen saavuttamiseksi.¹¹⁸

Toinen sukupolvi on yleistetty gradienttiapproksimaatio, joka nimensä mukaisesti riippuu osittain tiheysgradientista. GGA:lla etenkin nestemäisille näytteille voidaan laskea LSDA:ta parempia ennusteita, mutta näistä tuloksista huolimatta se ei ole täysin sovellettavissa käytännön laskuihin ilman huomattavaa virhettä, sillä se aliarvioi LSDA:n tapaan energiavallien suuruuden. Kolmannen sukupolven laskuja kutsutaan meta-GGA –funktioiksi ja niihin on aikaisemmissa sukupolvissa huomioon otettujen asioiden lisäksi liitetty spinien kineettisten energioiden tiheyksien muuttujat.¹¹⁸

Hybridifunktionaalit, joissa vaihto-korrelaatio funktionaaleissa käytetään HF-laskuja, voidaan pitää neljäntenä DFT-sukupolvena. Vaikka hybridifunktioilla on paljon hyviä puolia ja ne ovat suhteellisen suosittuja, voi niidenkin käytössä osoittautua ongelmia esimerkiksi energiavallien suuruuden arvioinnissa. Siirtymämetallien tapauksessa hybridifunktiot antavat tyypillisesti epäluotettavia/huonoja tuloksia ja niitä tutkittaessa olisikin syytä käyttää esimerkiksi lokaaleja funktioita osuvampien tulosten saavuttamiseksi.¹¹⁸ Yhdisteille, joille elektronisten vuorovaikutusten vaikutus siirtymään on huomattava, on todettu hybridifunktioiden käyttämisen antavan osuvampia tuloksia kuin tavallisten DFT-laskujen.⁹⁸ Vielä alle kymmenen vuotta sitten edes hybridifunktioilla ei kuitenkaan kyetty ottamaan huomioon heikkoja vuorovaikutuksia, minkä vuoksi tuloksissa oli havaittavissa suurta systemaattista virhettä. Ainoastaan dispersiovoimien vaikutus voitiin jo aikaisemmin huomioida jollain tasolla, kunhan tällöin käytettiin laajaa kantajoukkovalikoimaa. Nykyään heikot vuorovaikutukset on sisällytetty laskuihin, minkä myötä tulokset vastaavat paremmin kokeellisia arvoja.¹¹⁸

7.3.3. *Ab initio* -menetelmät

Kuten DFT-laskuissa, myös *ab initio* -menetelmissä pyritään ratkaisemaan Schrödingerin yhtälö (Yhtälö (32)). *Ab initio*-menetelmissä tätä ei kuitenkaan tehdä elektronitiheyttä kuvaavilla funktioilla, vaan yhtälön ratkaiseminen tehdään erilaisten aaltofunktioteorioiden mukaan, kuten esimerkiksi käyttämällä Hartree-Fock (HF) teorian mukaisesti Slaterin determinantteja, joiden mukaan aaltofunktion merkki muuttuu elektronivaihdon yhteydessä. Samalla aaltofunktioteorioiden ratkaisemiseen käytetään useita erilaisia approksimaatioita, jolloin aaltofunktiot itse mielletään stationäärisiksi, eli ajasta ja paikaista riippumattomiksi. Kaikki laskujen suureet esitetään laaduttomina, eli atomin arvojen, kuten elektronin massan tai varauksen, moninkertoina ja energia saa tällöin yksikön Hartree (E_h).

Kun *ab initio* -laskuja suoritetaan monielektronisille systeemeille, pitäisi Schrödingerin yhtälöön todellisuuden mukaan lisätä elektronien kokemaa repulsiota kuvaava termi. Tällöin aaltofunktion stationäärinen olemus kuitenkin muuttuisi, sillä repulsio on riippuvainen kaikkien huomioitavien elektronien koordinaateista avaruudessa. Koska tässä tapauksessa yhtälöä ei voitaisi ratkaista tarkasti, vältetään ongelma tyypillisesti käyttämällä Hartree-Fock likimääräismenetelmää, jossa elektronien liikkeen oletetaan olevan toisistaan riippumattomia, jolloin muiden elektronien vaikutus otetaan huomioon kuvaamalla tutkittavan elektronin liikettä muiden systeemin elektronien muodostaneessa keskimääräisessä kentässä. Tämä tehdään olettamalla laskuissa elektronien sijaitsevan spinorbitaaleilla, joille ne sijoittuvat kvanttimekaanisten perussääntöjen, kuten Paulin kieltoäännön mukaan. Kieltoääntöä seuraamalla voidaan käyttää Slaterin determinanttia, koska elektronien aaltofunktiot vaihtavat merkkiä elektronin vaihdon yhteydessä ja ovat näin ollen antisymmetrisiä.

Tyypillisesti *ab initio*ssa käytetään myös itseytyvän kentän menetelmää (eng. Self-Consistent Field, SCF), jossa Hartree-Fock yhtälö iteroidaan ratkaisemalla se alkuarvauksen perusteella niin monta kertaa, että peräkkäisten toistojen energioiden ja orbitaalien muutokset ovat tarpeeksi pieniä. Kuten tiheysfunktionaalilaskuissakin, myös *ab initio* -menetelmää käytettäessä törmätään koordinaattiriippuvuusongelmaan (eng. gauge problem). *Ab initio*ssa tämä johtuu siitä, että ytimen kokeman varjostuksen laskuissa, eli kemiallista siirtymää ennustettaessa, *ab initio* -laskuissa käytetään molekyyliorbitaaleja, joiden keskipisteen oletetaan olevan atomien ytimissä. Laskuissa molekyyliorbitaalit hajotetaan atomiorbitaaleihin, joita kuvataan joko Slaterin orbitaaleilla (STO) tai Gaussin orbitaaleilla (GTO). Slaterin orbitaalit ovat tarkkoja aaltofunktioita, jotka vastaavat vedynkaltaisia atomeja, kun taas Gaussin orbitaaleissa aaltofunktio on muodostettu Gaussin funktiosta ja näin ollen useamman elektronin likimääräistäminen niillä on helpompaa.¹²⁰

Geometrisiä ominaisuuksia, kuten molekyylin jatkuvaa konformaation muutosta näytteessä voidaan kuvata *ab initio* laskuissa magneettisella anisotropialla, jolloin konformaation muutos voidaan laskea liuottimen ja konsentraation funktiona.¹³ Myös molekyylin sisäisen rotaation vaikutus kemialliseen siirtymään on helppo ottaa osuvasti huomioon. Esimerkiksi molekyylin siirtymien eroja planaarisien ja hieman epäplanaarisen konformaation välillä voidaan ennustaa.¹²¹ Koska useita eri tekijöitä ja hienosten muutosten vaikutukseen liittyviä termejä on suhteellisen helppo lisätä laskuihin tarkemman ennusteen saavuttamiseksi, on *ab initio* -laskuissa vaarana korostaa geometrian merkitystä siinä mittasuhteessa, että laskennallinen puoli muuttuu turhan haastavaksi tai aikaakuluttavaksi.¹⁰⁶ Kompromisseja onkin tehtävä laskuja suunnitellessa silti samalla pyrkien mahdollisimman tarkasti todellisuutta vastaavaan lopputulokseen.

7.3.4. Koordinaattiriippuvuusongelma

Kvanttimekaanisissa laskuissa ulkoisen magneettikentän ja molekyylin eri energioita edustavan Hamiltonin operaattorin vuorovaikutusta on kuvattava oikein, mikä tarkoittaa magnetisaation mittarina toimivan vektorin koordinaattien kuvaamista tarkasti. Tämä osoittautuu toisinaan ongelmalliseksi niin sanotun koordinaattiriippuvuusongelman yhteydessä, sillä laajoja kantajoukkovalikoimia käytettäessä staattinen magneettikenttä vaikuttaa kineettisen energian laskuihin, jolloin operaattori riippuu koordinaatiston origosta.⁹⁹ Ongelma juurtaa approksimaatioiden käytöstä, sillä dia- ja paramagneettiset termit, joiden summa on origosta riippumaton, mutta jotka itsessään riippuvat koordinaateista, sekä muut origosta riippuvat termit, kumoavat toisensa täydellisissä laskuissa. Kun laskuissa käytetään useita eri approksimaatioita, joiden virheet ovat erisuuret, termit eivät kumoakaan toisiaan ja laskujen tuloksista tulee virheellisiä. Approksimaatioiden käyttö on kuitenkin tarpeellista, jotta laskut pystytään ratkaisemaan numeerisesti. On todettu, että kun origo sijoitetaan mahdollisimman lähelle tarkasteltavan molekyylin elektronijakauman keskikohtaa, saadaan jopa approksimaatioiden kanssa kaikkein parhaita tuloksia. Jos tutkittava osa on yksittäinen atomi, on vektorin origo syytä sijoittaa sen keskipisteeseen.¹⁰²

Koordinaattiriippuvuusongelman ratkaisemiseen on tarjolla useita laskumenetelmiä, kuten GIAO (gauge including atomic orbitals, alun perin gauge-invariant, tunnetaan myös nimellä London orbitaali)¹⁰², IGLO (individual gauge for localized orbitals), CSGT (continuous set of gauge transformations) tai LORG (localized orbitals, local origin). Näitä menetelmiä käyttämällä koordinaattiriippuvuusongelman vaikutus laskuihin minimoidaan varjostusta laskettaessa.^{106,17} Edellä mainituista menetelmistä GIAO on yleisesti suurimmassa suosiossa,^{12,15,122,99,8} joskin

ohjelmistoja vertailtaessa on todettu, että keksimäärin CSGT antaa parempia tuloksia ^{13}C -siirtymiä ja IGLO ^1H -siirtymiä laskettaessa.⁹⁹ Näiden kahden ohjelmiston on todettu antavan tarkkuudeltaan samanlaisia tuloksia, jos molemmissa käytetään hyvin laajaa kantajoukkovalikoimaa.¹⁵

GIAO perustuu kentästä riippuville funktioille, sillä siinä laskuihin sisällytetään lokaali mitta (eng. gauge), jolla lasketaan ulkoisen magneettikentän vektori, joka tätä kautta voidaan ottaa huomioon.^{15,117} Käytännössä tämä tarkoittaa, että vaikka likimääräismenetelmien käytön vuoksi tarkan elektronisen aaltofunktion yhtälöä, joka on riippuvainen elektronin paikasta avaruudessa, ei voida eksaktisti ratkaista, niin GIAO:lla laskut voidaan pakottaa ratkaisemaan kyseinen yhtälö. Tämä tehdään laajentamalla aaltofunktiota toisilla funktioilla, johon on sisällytetty atomiorbitaaleja sekä paikkakoordinaatit huomioiva termi. Laajennetulla aaltofunktiolla yhtälöä ratkaistaessa orbitaalien vaikutus johtaa siihen, että vain tulokset, jotka täyttävät tarkan paikasta riippuvan elektronisen aaltofunktion yhtälön, huomioidaan.¹⁰² Tehokkuutensa ja tarkkuutensa vuoksi GIAO on suosittu menetelmä, mutta se on skaalattava empiirisiin menetelmin ja liuottimen vaikutus otettava huomioon laskuissa muilla tavoin, jotta tulokset olisivat todenmukaiset.

CSGT:ssä korjaus suoritetaan empiiristen laskukaavojen avulla laskemalla hiukkasen paikkakoordinaattien vektori ja näin ollen aiheutettu magneettikenttä avaruuden joka pisteessä.^{15,102} Koordinaatti-riippuvuusongelma voidaan ratkaista myös käyttämällä suuria kantajoukkovalikoimia. Tämä johtuu siitä, että teoriassa lähes täydelliset kannat johtavat siihen, että tulokset ovat lokaalista mitasta riippumattomia, koska ne täyttävät tarkan paikasta riippuvan elektronisen aaltofunktion yhtälön itsessään.¹⁰² Käytännössä laajojen kantajoukkovalikoimien käyttö ongelman ratkaisemiseen on kuitenkin sovellettavissa vain pienille

molekyyleille, eikä ole sopivat suuremmille systeemeille,¹¹⁷ koska yhdisteen koon kasvaessa ja rakenteen monimutkaistuessaa molekyyliorbitaalien kuvaaminen kantajoukoilla muuttuu entistä haastavammaksi ja lähes täydellisten kantojen kokoaminen on lähes mahdotonta ja aikaa vievää.

IGLO- ja LORG-menetelmät ovat omalla tavallaan GIAOn sovelluksia, joissa laskuja on muokattu hinnan keventämiseksi ja jotka antavat keskimäärin osuvia, joskin hieman ympäripyöreitä tuloksia.¹²² Ne eivät kuitenkaan sovellu kunnolla delokalisoituneita elektroneita sisältävien rakenteiden laskuihin, koska molemmissa lokaali mitta otetaan huomioon vain lokaaleissa molekyyliorbitaaleissa kaikkien atomiorbitaalien sijaan. Jo menetelmien alkuaikoina todettiin, että GIAO on sekä IGLOa että LORGia nopeampi ja paremmin verrattavissa kokeelliseen dataan, eivätkä sen tulokset ole yhtä vahvasti riippuvaisia kantajoukkojen muutoksista, vaikka se onkin hinnaltaan kahta jälkimmäistä korkeampi.¹¹⁷

GIAO:lle perustuvien laskelmien ¹³C-atomien varjostuksesta on todettu pitävän hyvin paikkansa, kunhan elektronien korrelaatio otetaan laskuissa huomioon tiheysfunktioaaliteorian avulla,^{91,106,123} ja GIAO onkin suosituin tapa absoluuttisten varjostusten laskemiseen.¹⁶ Spektriä ennustettaessa suurempikokoisille molekyyleille joudutaan kuitenkin muuttamaan lähestymistä korrelaatioiden huomioonottamiseen, jolloin käytetään usein esimerkiksi GIAO/DFT ja CSGT/DFT laskuja. Näissä malleissa magneettinen varjostus lasketaan tiheysfunktioilla ja tämä yhdistetään kvanttimekaanisiin molekulaarisiin laskuihin, joilla rakenne optimoidaan. Tällä tavoin laskuja voidaan yksinkertaistaa ja pitää niihin kuluva aika järkevissä mittasuhteissa.⁹¹

7.3.5. Liuottimen ja vetysitoutumisen huomioon ottaminen kvanttimekaanisissa laskuissa

Liuottimen vaikutus ytimen kemialliseen siirtymään voi olla huomattava, mutta sitäkin on alettu ottaa huomioon kvanttimekaanisissa laskuissa vasta viime aikoina. Esimerkiksi ACD:n (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario, Kanada) -ohjelmisto ei vielä vuosikymmen sitten ottanut liuotinta huomioon laskuissaan, joten ennusteet eivät aina vastanneet kokeellisia tuloksia.³³ Liuottimen vaikutuksen huomioimiseen käytetään tyypillisesti kuvaamalla liuotinmolekyylejä joko itsenäisinä kappaleina, jotka vuorovaikuttavat toistensa sekä näytemolekyylien kanssa, rykelmiä muodostavina hiukkasina, joiden vuorovaikutus näytteen kanssa on rajoittunutta, tai ympäristönä, jossa näytemolekyylien ja liuottimen välillä ei juurikaan ole vuorovaikutuksia. Jälkimmäisimmässä tapauksessa puhutaan metodina dielektrisestä jatkumosta (eng. dielectric continuum), jossa liuenneiden näytemolekyylien kuvataan sijoittuvan liuottimen muodostaneiden onkaloiden sisään. Kun liuotinta kuvataan yksittäisinä hiukkasina, sisällytetään liuotinmolekyylit erillisinä kappaleina kvanttimekaanisten laskujen piiriin, ja molekyyli ryppäitä kuvattaessa käytetään tarkkoja malleja, jotka jakavat ryppäät kvanttimekaaniseen ja molekyylimekaaniseen (eng. molecular mechanics) osaan.^{71,92,33,80,102}

Liuotinvaikutusta laskettaessa käytetään usein likimääräismenetelmiä, kuten Hartree-Fock teoriaa.¹⁷ Jatkumokuvaus on suosittu toimintatapa erityisesti silloin, kun siirtymä mallinnetaan poolittomissa liuottimissa,³³ ja sen on todettu antavan todenmukaisia tuloksia liuotinvaikutuksen ja siirtymän yhteydestä.⁸⁰ Saman tyyppisesti tiheysfunktionaalilaskuja voidaan käyttää hyväksi kiinteiden aineiden, kuten zeoliittien, aktiivisten kohtien vuorovaikutuksen tutkimiseksi liuottimen ja näytteen välillä.¹²⁴

Kuten muissakin laskennallisissa menetelmissä, myös kvanttimekaanisissa laskuissa vetysitoutuminen on otettava huomioon totuudenmukaisen ennusteen saavuttamiseksi. Tämä pitää erityisesti paikkansa *ab initio* tapauksessa, vaikka intermolekulaaristen vuorovaikutusten huomioonottaminen näissä laskuissa onkin haastavaa.^{106,114} GIAO- ja DFT-menetelmien on todettu täyttävän tämän tarpeen hyvin, vaikka DFT:n suorituskky riippuu tällöin pitkälti käytetyistä XC-funktionaaleista.^{16,114} Esimerkiksi LDA:n käyttö yliarvioi vetysidosten voimakkuuden, mutta muilla yleisillä XC-funktiolla saadaan melko todenmukainen tulos.¹¹⁴ Tapauksissa, joissa tutkittu ydin ei ota voimakkaasti osaa vetysitoutumiseen, kuten alifaattisten protonien tapauksessa huoneenlämmössä, liuottimen ja ytimen vetysitoutumista ei tarvitse sisällyttää kvanttimekaanisiin laskuihin tarkkojen tulosten saavuttamiseksi. Alifaattisten protonien tapauksessa näin on todettu olevan yllättävästi jopa vesiliuoksissa huoneenlämmössä, joskin korkeammissa lämpötiloissa pieniä muutoksia (noin 0,06 ppm) siirtymissä havaittiin.⁸⁰

7.3.6. Kvanttimekaanisten menetelmien vertailua toisiinsa ja muihin laskennallisiin menetelmiin

Kvanttimekaanisissa laskuissa erilaiset rakenteelliset tekijät voidaan keskimäärin ottaa huomioon osuvasti ja tehokkaasti, mutta tällöinkin eri ennusteissa voi olla huomattavia eroja. Tästä esimerkkinä on se, että kvanttimekaanisesti tuotettujen ennusteiden suhteen on todettu, että protonispektrin siirtymät cis- ja trans-isomeereille voidaan laskea kokeelliseen dataan nähden tarkemmin kuin esimerkiksi hiilispektrin siirtymät. Näin ollen kvanttimekaanisesti tuotettu ^1H NMR spektri on näiden isomeerien tutkimuksessa samalla tavalla lasketun ^{13}C NMR spektriä luotettavampi.⁸⁴

Ab initio- ja tiheysfunktionaalilaskujen tehokkuutta ja tarkkuutta on vertailtu useissa tutkimuksissa, mutta johtopäätökset eivät ole täysin yksiselitteisiä.⁹² Osassa tutkimuksista tiheysfunktionaalien on todettu olevan *ab initio* laskuja tarkempia,^{98,99} kun taas joissain tapauksissa asian on todettu olevan päinvastoin, varsinkin ^{13}C -siirtymien ennustuksessa.¹²³ Tiheysfunktionaalisten laskujen virhe on keskimäärin systemaattista, joten se voidaan ottaa laskuissa huomioon lineaarisilla korjauksilla ja parantaa näin menetelmän tarkkuutta.¹²⁵ Näin ollen kvanttimekaanisia menetelmiä verratessa suuren eron vertailuihin tekee se, otetaanko korjauksia huomioon.⁹² Huolimatta siitä, otetaanko korjauksia huomioon vai ei, DFT-laskuissa hinnan ja tarkkuuden suhde on kuitenkin keskimäärin paras kvanttimekaanisista laskuista.¹²⁵ Tämä johtuu ainakin osittain tiheysfunktionaalien kyvystä ottaa laajemmassa määrin erilaisten yhdisteiden piirteet huomioon muihin laskumenetelmiin verrattuna. Esimerkiksi keskimäärin voidaan todeta, että koska HF-teoria ei ota huomioon elektronikorrelaatiota, aiheutuu tästä virhettä vahvasti poolisten ja isojen molekyylien siirtymien laskemisessa.¹¹⁵ Osassa tutkimuksista on

todettu, että HF-laskuissa yksittäisten siirtymien ennusteet pitävät hyvin paikkansa, mutta J-kytkentöjen arvot vaihtelevat kokeellisista arvoista, kun taas DFT-laskujen tapauksessa tulos on päinvastainen.⁹³

Kvanttimekaanisten laskujen etuna empiirisiin menetelmiin verrattuna on se, että niitä varten ei tarvita vertailutietokantaa, kuten empiiristen algoritmien koulutusvaiheessa.⁷⁶ Osittain tämän takia kvanttimekaaniset laskut sopivatkin paremmin epätavallisemmille yhdisteille.¹² Empiirisiin menetelmiin verrattuna kvanttimekaanisten mallien ongelmaksi voivat kuitenkin muodostua hitaus ja käytettyjen laskujen laajuuden valinnan vaikeus.⁷⁶ Lisäksi varsinkin *ab initio* -laskut ovat varsin riippuvaisia kantajoukostaan, kohdemolekyylin geometriasta sekä analyytin ja liuottimen välisistä vuorovaikutuksista.⁵⁶ Näiden muuttujien monimutkaistaessa laskuja jotkin tutkimukset ovat tulleet tuloksiin, että keskimäärin kvanttimekaanisin menetelmin lasketut siirtymät ovat vastaavia empiirisesti laskettuja tuloksia huonompia tarkkuutensa puolesta.¹¹⁵ Toisaalta yksittäisissä tapauksissa on myös todettu, että klassiset laskennalliset mallit eivät kykene osuvasti ennustamaan haluttua siirtymää, vaan korjaus on suoritettava kvanttimekaanisin menetelmin. Tästä esimerkkinä on hydroksyylin protonin siirtymä tapauksessa, jossa vedyn etäisyys karbonyyliryhmän happeen on pienempi kuin 2Å.⁵⁶

7.4. Semi-empiiriset menetelmät

Semi-empiiriset menetelmät ovat osittain kvanttimekaanisten menetelmien piiriin kuuluvia laskuja, joissa ytimen varjostusta laskettaessa ei kuitenkaan käytetä puhtaasti kvanttimekaanisten menetelmien lailla elektronista Hamiltonin operaattoria tai oteta elektronien korrelaatiota huomioon XC-funktioilla, vaan niiden sijaan käytetään parametrisoituja funktioita (eng. parametric formulas), joissa funktioihin on sisällytetty esimerkiksi koordinaatteja kuvaavia parametreja.¹⁰² Menetelmässä Hartree-Fock teoriaa yksinkertaistetaan erilaisin likimääräismenetelmin ja empiiristä dataa käytetään tulosten korjaamiseen, jolloin menetelmä ei ole puhtaan kvanttimekaaninen, eikä varsinaisesti myöskään empiirinen. Semi-empiiristen menetelmiä kehitettiin jonkin verran 1990-luvun ja varhaisen 2000-luvun aikaan, joskin niitä oli olemassa jonkin verran jo aikaisemminkin, ja niiden suosio on sittemmin romahtanut, eikä niitä nykyään enää juurikaan käytetä kemiallisen siirtymän ennustamiseen.¹⁰²

Eräitä semi-empiirisiä menetelmiä ovat esimerkiksi MINDO/3 (Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap, kolmas versio) ja MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap),¹²⁶ joiden käytettävyys on kuitenkin heikkoa laskujen hitauden vuoksi, mutta niistä kehittyneempi versio ja yksi tyypillisimmistä menetelmistä on Austin Model 1 (AM1).^{96,126,127} MINDO/3 ja MNDO eivät kykene laskemaan siirtymiä hyväksyttävässä ajassa systeemille, joka sisältää vedystä poikkeavia atomeja, ja on sen vuoksi varsin käyttökelvoton tutkimuksen tarpeisiin.¹²⁶ Muita perinteisempiä menetelmiä ovat CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap) ja INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap). Eräs semi-empiirinen ohjelmisto on CHARGE, joka käyttää inkrementaalisia menetelmiä laskeakseen siirtymät useille eri funktionaalisille ryhmille. Tällöin parametreilla otetaan huomioon

esimerkiksi steeriset ja elektroniset vaikutukset. CHARGE:n laskuja ei ole optimoitu stereorakenteen suhteen, mutta ohjelma vaatii 3D-rakenteen laskuja varten, sillä osa laskuista suoritetaan substituenttien siirtymät huomioon ottaen.⁷⁵

Semi-empiiristen menetelmät olivat varsinkin aikaisemmin laskennallisesti huomattavasti kvanttimekaanisia malleja halvempia tarjoten samalla suhteellisen hyvän tarkkuuden,^{96,126} mutta niiden suosion laantumista selittää jo aikaisemmin mainittu tietokoneiden kehityksen myötä helpottunut kvanttimekaanisten laskujen hyödyntäminen. Kun laskujen hinta ei ole ollut enää kynnyskysymys menetelmän valinnassa, on tulosten osuvuuden tärkeyden merkitys noussut uuteen asemaan. Sama pätee semi-empiiristen menetelmien vertaamista empiirisiin, sillä silloinkin keskivirhe on semi-empiirisissä laskuissa usein isompi kuin empiirisissä.⁹⁶ Muutenkin aikaisemmin semi-empiiristen mallien hyödyntäminen keskittyi lähinnä suurten ja monimutkaisten molekyylien siirtymien ennustamiselle, sillä niitä hyödynnettiin esimerkiksi proteiinien laskuissa.⁹⁶ Semi-empiiristen menetelmien käyttöä rajoittavat pääosin kantajoukkovalikoimansa pienuus ja käytetyt likimääräismenetelmät.⁹⁶

8. Kirjallisuuskatsauksen yhteenveto

Kemiallisen siirtymän herkkyys ja muutoksen suuruus erilaisille parametreille vaihtelee yhdisteestä toiseen ja se voi osoittautua tutkimuksessa ongelmaksi, jos muutosta ei ymmärretä eikä näin ollen osata ennakoida. Koska eri tekijöitä on kuitenkin tutkittu suhteellisen kattavasti, on ollut mahdollista kehittää tutkimusmenetelmiä ja käyttää herkkyyttä hyväksi analyysissä, jolloin siirtymän muutoksen avulla saadaan uutta informaatiota näytteestä ja yhdisteestä. Yhteenveto eri parametrien vaikutuksesta kemiallisiin siirtymiin on esitetty kappaleessa ”3.2. Yhteenveto eri parametrien vaikutuksesta kemialliseen siirtymään” (Taulukko 4). Siirtymän suuruutta ja sen muutosta voidaankin mallintaa erilaisin laskennallisin ennustusmenetelmin, joiden avulla useiden tekijöiden yhteisvaikutus voidaan ottaa huomioon ja näin tehostaa monimutkaisissakin näytematriiseissa ja -seoksissa olevien yhdisteiden tutkimista.

Laskennallisia menetelmiä on monia ja kullakin niistä on omat vahvuutensa ja heikkoutensa. Menetelmien laaja kirjo tarjoaa lukuisia mahdollisuuksia kemiallisen siirtymän ennustamiseen ja toisinaan menetelmät antavatkin toisistaan huomattavasti eroavia tuloksia, jolloin lopullisen ennusteen tekemiseen on valittava tilanteeseen parhaiten sopivat ohjelmisto. Erilaiset menetelmät eivät ole yleisellä tasolla yksiselitteisesti vertailtavissa, sillä menetelmien toimivuus ja tarkkuus vaihtelevat laajalti näytteestä ja tutkitusta yhdisteestä ja ytimeistä riippuen. Näin ollen sopiva menetelmä onkin valittava tapauskohtaisesti, sillä toisinaan yksinkertaistetut empiiriset kaavat antavat todenmukaisempia tuloksia kuin lukuisia muuttujia huomioon ottavat kvanttimekaaniset raskaat laskut, kun taas muulloin luotettavia ennusteita ei välttämättä saada ilman kaikkien muuttujien huomioonottamista. Yhteenveto erilaisista kemiallisen

siirtymän laskennallisista ennustusmenetelmistä on esitetty kappaleessa ”7.1. Yleistä laskennallisista menetelmistä” (Taulukko 5), sivu 88.

Osa menetelmistä on koulutettava ennen käyttöönottoa, jotta niiden antamat tulokset olisivat luotettavia. Näihin lukeutuvat empiiriset menetelmät, kun taas kvanttimekaanisten laskujen etuna on niiden pohjaaminen teoreettiselle fysiikalle, jolloin ne eivät vaadi koulutusta toimiakseen ja antaakseen osuvia tuloksia.

Käytännön osuus

9. Tavoitteet ja yleistä käytännön osuudesta

Pro Gradu tutkielman käytännön osuus suoritettiin Helsingin yliopiston kemian laitoksen Kemiallisen aseiden kielto sopimuksen instituutti (VERIFIN) -yksikössä ja sen tavoitteena oli määrittää kuuden erilaisten kemiallisiin taistelua-aineisiin ja niiden hapetustuotteisiin liittyvien arseeniyhdisteiden ^1H -NMR spektrien kemiallisten siirtymien pH-riippuvuudet metanolissa, sekä tarkastella Adamsiitin arsiinihapon konsentraatiiriippuvuutta samassa liuottimessa. Lisäksi siirtymien pH-riippuvuuksien tutkimuksesta saatujen tulosten avulla tarkasteltiin Euroopan Unionin Interreg Baltic Sea Region Daimon projektin yhteydessä Itämerestä Bornholmin alueelta kerättyjä sedimenttinäytteitä, joille suoritettiin näytteenkäsittely ja NMR-näytteiden valmistus ennen tutkielman käytännön osuuden alkua. Sen lisäksi, että aromaattisia arseeniyhdisteitä seulottiin sedimenttinäytteistä sekä NMR spektroskopian että muiden analyttisten menetelmien, kuten kaasukromatografia-massaspektrometrian (GC-MS:n) sekä nestekromatografia-massaspektrometrian (LC-MS:n), avulla, tähdättiin seulonnassa identifioimaan muitakin näytteiden protonispektreissä havaittuja aromaattisia yhdisteitä.

10. Laitteisto ja ohjelmistot

Kaikki tutkielman käytännön osuuden aikana valmistettujen NMR näytteiden spektrit tuotettiin Bruker Avance III 500 -spektrometrillä 500 MHz:n kentässä 290 K:ssa. Näytteitä valmistettiin kahdella eri tilavuudella; i) 600 µl:n ja ii) noin 45 µl:n suuruisia. Ensimmäisiä nimitetään tutkielmassa myös nimellä ”tavalliset NMR-näytteet” ja jälkimmäisiä nimellä ”mikro-NMR näytteet”. Tilavuudeltaan 600 µl:n näytteiden mittauksissa käytettiin 5mm TXI näyteyksikköä ja näytteiden ¹H NMR spektrit ajettiin 16 skannauksella. Mikro-NMR näytteiden kokeissa puolestaan käytettiin 1.7 mm TXI näyteyksikköä ja protonispektrien ajaminen tehtiin 32 skannauksella. NOE-differenssimittauksissa skannausten määrä poikkesi edellä mainituista arvoista ja vaihteli eri kokeiden välillä vaihdellen 16 skannauksesta noin 8000:een, mutta kaikissa protonimittauksissa toistoväli oli 15 s, keräysaika 4,37 s, ja pulssikulma 90 astetta. Kaikki spektrit mitattiin hyödyntäen presaturaatio - vesisuppressiota 290 K:ssä, jollei toisin mainita. Deuteroitua metanolia (MeOH-d₄) käytettiin lukkoreferenssinä, ja osittain protonoituneen metyylin kvintettiä käytettiin siirtymäreferenssinä (δ_H 3,31). Spektrit käsiteltiin Brukerin TopSpin 3.0 ohjelmistolla.

Sedimenttinäytteiden käsittelyssä käytettiin Agilent 1200 HPLC-laitteistoa varustettuna fraktionkerääjällä. Sedimenttinäytteiden sekä puhdasaineiden kantaliuoksien LC-MS analyysit tehtiin Thermo Fisher Finnigan LXQ –laitteella, ja LC-MS/MS –analyysit tehtiin Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 UHPLC –laitteella yhdistettynä Thermo Fisher Scientific Orbitrap massaspektrometriin. GC-MS –analyysit tehtiin Agilent 6890N Network GC System yhdessä Agilent 5975B Inert XL EI/CI MSD:n kanssa. Näytetilavuuksien pienentämiseksi haihdutuksessa hyödynnettiin GeneVac Ez-2 –sentrifuugi-evaporaattoria ja TurboVap LV -

typpikaasuevaporaattoria. Sekä sedimenttinäytteiden että puhdasaineista valmistettujen näytteiden pH-mittauksiin käytettiin Mettler Toledo Inlab NMR elektrodia yhdistettynä Mettler Delta 340 –pH-mittariin. pH-mittari kalibroitiin päivittäin käyttäen sertifioituja pH-puskureita (pH 4, pH 7 ja pH 10)

Spektrien iterointi suoritettiin PERCH-ohjelmistolla ja spektristä näin selvitettyjen parametrien perusteella esitettiin kuvaajana koordinaatistossa protonien resonanssien ja pH:n suhde. Tämä tehtiin Matlabilla sovittamalla pistejoukkoihin pH-riippuvuuden teorian mukainen käyrä kussakin tapauksessa (MATLAB 2016a, The MathWorks Inc., Natick, MA). Käyrien sovitusten yhteydessä saatiin selville myös virherajat sovitukselle sekä tutkittujen rakenteiden osittain ja täydellisesti protonoitujen ja deprotonoitujen muotojen kokeellisten kemiallisten siirtymien arvot.

11. pH-mittaus metanolissa

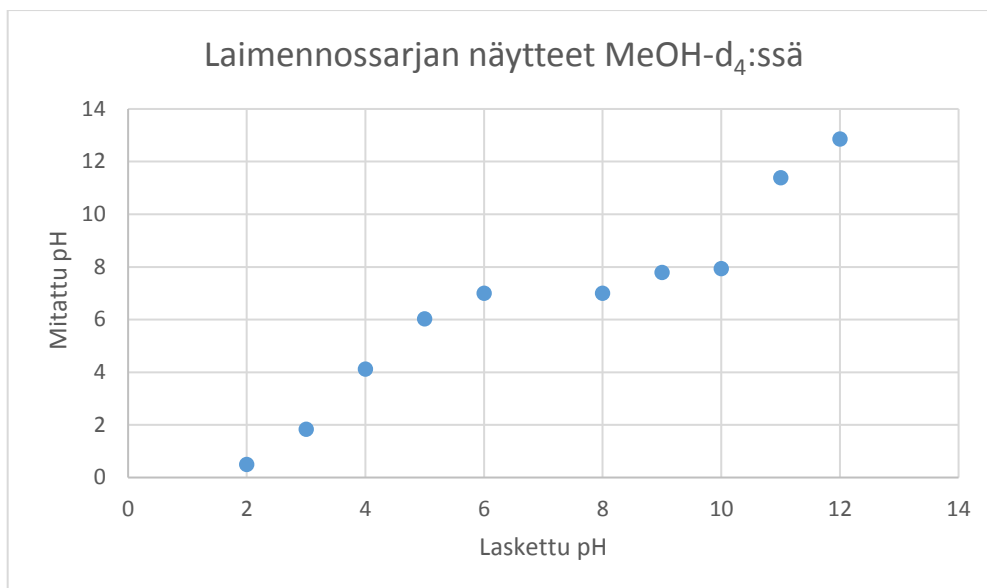
Koska tutkielman käytännön osuuden suoritusvaiheessa pH-elektrodin kyvystä mitata osuvasti näyteliuoksen pH, kun liuottimena käytettiin metanolia veden sijaan, ei oltu täysin varmoja, päätettiin ennen varsinaisten näytteiden tutkimista tarkastella, kuinka hyvin mitatut pH-arvot vastasivat laskennallisia tuloksia. Tämä tehtiin valmistamalla laimennossarja mittaamalla vialeihin tarvittava määrä ionivaihdettua vettä ja joko 1 M HCl:a tai 1N NaOH:a Taulukon 6 mukaan. Jokaisesta näytteestä siirrettiin 50 µl insertteihin ja näytteiden pH:t mitattiin. Kyseistä laimennossarjaa käytettiin kaikkien tutkittujen aromaattisten arseeniyhdisteiden pH:iden säätämiseen. Metanolinäytteiden pH-mittauksen testaamiseksi laimennossarjan näytettä lisättiin 1 µl insertteihin, joihin oli mitattu 100 µl MeOH-d₄:a ja näytteiden pH:t mitattiin (Taulukko 5, Kuva 41).

Taulukko 4: Metanolinäytteiden pH:iden säätämiseen käytetyn laimennossarjan näytteiden tiedot (tilavuus, konsentraatio, lisätyn HCl- tai NaOH-liuoksen tilavuus, laskettu pH sekä mitattu pH)

V(näyte) (µl)	c(näyte) (M)	V(1M HCl) (µl)	laskettu pH	Mitattu pH
100	1	100	0	0,02
100	0,1	10	1	0,96
100	0,01	1	2	2,11
1000	0,001	1	3	3,06
10000	0,0001	1	4	6,81
V(näyte) (µl)	c(näyte) (M)	V(NaOH) (µl)	pH	
10000	0,0001	1	10	8,82
1000	0,001	1	11	10,96
100	0,01	1	12	11,88
100	0,1	10	13	12,94
100	1	100	14	13,69

Taulukko 5: MeOH-d₄ pH-sarjan näytteiden pH:iden lasketut ja kokeelliset arvot

Lisätyn laimennossarjan näytteen pH	Laskettu pH	Mitattu pH
0,02	2	0,50
0,96	3	1,83
2,11	4	4,12
3,06	5	6,03
6,81	6	7,00
8,82	8	7,00
10,96	9	7,79
11,88	10	7,93
12,94	11	11,38
13,69	12	12,86



Kuva 41: Laimennossarja MeOH-d₄-näytteiden mitatut pH:t lasketun pH:n funktiona

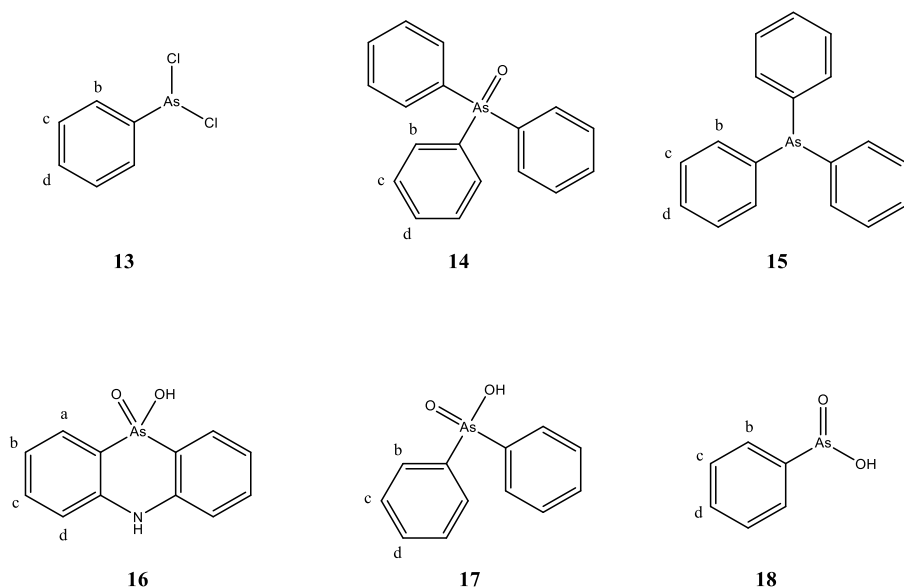
Tulosten perusteella todettiin, että elektrodilla pystyttiin mittaamaan metanoliliuoksen pH, mutta tulosten vertailu vesiliuokseen perustuvien laskujen avulla saavutettuihin teoreettisiin arvoihin ei ollut mielekäästä ainakaan ilman tarkkaa kaavaa. Todettiin, että mittausten tarkkuus oli riittävä kokeellisen osuuden tarkoituksperiin, varsinkin, kun kaikki näytteet valmistettiin samaan tapaan ja samaan liuottimeen. Koska vertailua liuottimien välillä ei näin ollen tulosten tarkasteluun vaadittu, todettiin $w^s\text{pH}$ -arvojen käytön sellaisenaan olevan perusteltua.

12. Puhdasaineisiin kohdistuvat tutkimukset

12.1. Arseeniyhdisteiden kantaliuosten valmistus

Koska sedimenttinäytteet, joiden analyysiin puhdasaineiden tutkimuksista saatuja tuloksia hyödynnettiin, oli valmistettu jo kesän 2016 aikana, valittiin puhdasainetutkimusten kohdeyhdisteiksi aromaattisia arseeniyhdisteitä, joiden mahdollisesta läsnäolosta sedimenttinäytteissä oltiin kiinnostuneita. Sedimenttinäytteiden valmistus ja niiden tutkiminen on esitelty myöhemmissä kappaleissa.

Valikoidut puhdasaineet (Kuva 42) olivat fenyylidiklooriarseeni (PDCA, **13**), trifenyyliarseenioksidi (TPAO, **14**), trifenyyliarseeni (TPA, **15**), Adamsiitin arsiinihappo (DM-happo, **16**), difenyyliarsiinihappo (DPAA, **17**) ja monofenyyliarsiinihappo (MPAA, **18**).



Kuva 42: Tutkittujen arseeniyhdisteiden rakenteet: fenyylidiklooriarseeni (PDCA, **13**), trifenyyliarseenioksidi (TPAO, **14**), trifenyyliarseeni (TPA, **15**), Adamsiitin arsiinihappo (DM-happo, **16**), difenyyliarsiinihappo (DPAA, **17**) ja monofenyyliarsiinihappo (MPAA, **18**)

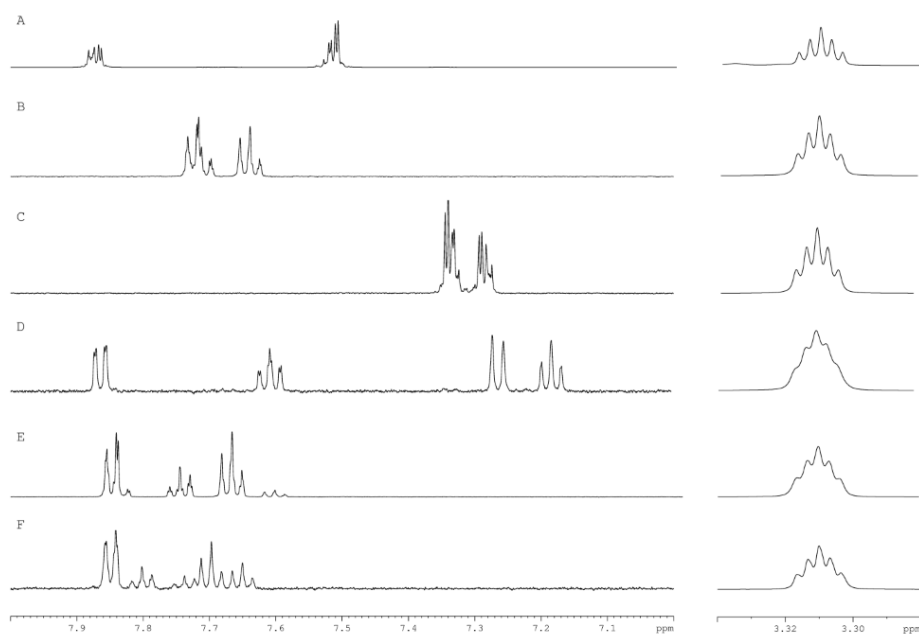
Yhdisteistä valmistettiin kantaliuokset, joista myöhemmät näytteet sekä laimennos- ja pH-sarjat kyettiin valmistamaan helposti ja toistettavasti. Liuokset valmistettiin punnitsemalla noin 1,0 mg ainetta vialiin (Huom! näytteet olivat tarkoitettu vain kvalitatiiviseen tutkimukseen, sillä määrä oli liian pieni mitattavaksi tarkkaan käytetyllä analyysivaa’alla) ja lisäämällä tarvittava määrä deuteroitua metanolia (MeOH-d₄) konsentraation 1,0 mg/ml saavuttamiseksi (Taulukko 6). Vaaka, jolla punnitukset suoritettiin, ei ollut laboratorion kalibraatiomääritelmien mukaan alle 10 mg:n punnitusten tapauksessa tarpeeksi tarkka kvantitatiiviseen tutkimukseen, joten valmistetut näytteet suunnattiin alusta asti vain kvalitatiivista tutkimusta varten. Puhdasaineista PDCA oli valmiissa kantaliuoksessa, jonka ilmoitettu konsentraatio oli 12,49 mg/ml, joten sitä mitattiin vialiin mittapipetillä tarvittava määrä laimeamman kantaliuoksen valmistamiseksi.

Taulukko 6: Kantaliuosten valmistus

Punnittava puhdasaine	m(puhdasaine tai kantaliuos) (mg)	V(MeOH-d₄) (ul)	c(kantaliuos) (mg/ml)	Rakenne nro. (Kuva 42)
PDCA	V=8,0 µl	100	1,0	11
TPAO	1,8	1500	1,2	12
TPA	1,4	1400	1,0	13
DM-happo	1,0	1000	1,0	14
DPAA	0,2	200	1,0	15
MPAA	1,5	1500	1,0	16

Kantaliuoksista valmistettiin sekä mikro-NMR -näytteet että 600 µl:n näytteet käyttäen liuottimena deutoitua metanolia, jolloin mikro-NMR -näytteiden konsentraatio oli noin 300 µg/ml ja 600 µl:n näytteiden konsentraatio noin 200 µg/ml. Mikro-NMR-näytteet valmistettiin mittaamalla mikro-NMR-putkeen 10 µl kantaliuosta ja lisäämällä sitten 30 µl:a MeOH-d₄:a. TPAO:ta mitattiin putkeen 8,3 µl kantaliuoksen suuremman konsentraation vuoksi. Näytteitä sentrifugoitiin edestakaisin kolmesti näytteen homogenoimiseksi. Kaikki tutkielman käytännön osuuden suorittamisen aikana valmistetut mikro-NMR näytteet valmistettiin samaan tapaan ja näytteet homogenoitiin sentrifugoimalla aina, kun putkiin piti lisätä liuotinta sopivan näytetilavuuden ylläpitämiseksi. Mikro-NMR -näytteiden perusteella todettiin, että PDCA:n alkuperäisen kantaliuoksen todellinen konsentraatio oli 12,5 kertaa ilmoitettua suurempi, eli 188, 21 mg/ml.

Mikro-NMR- ja NMR-näytteitä verrattiin toisiinsa, jolloin todettiin 600 µl:n NMR-näytteiden spektrien viivanleveyden eronneen jonkin verran mikro-NMR sarjan näytteistä. Resonanssien hienorakenne ei ollut näin ollen yhtä selkeä ja metanolipiikit olivat kaikissa pyöreähköjä, eivätkä erityisen symmetrisiä ja erityisesti DM-hapon osalta tämä aiheutti pientä epävarmuutta kaukokytcentöjen määrittämisessä (Kuva 43). Lisäksi mikronäytteissä hienorakenne oli 600 µl:n näytteitä huonompi. Näistä puutteista huolimatta voitiin sanoa, että siirtymät eivät olleet liikkuneet metanoliresonanssiin verrattuna tavallisia- ja mikro-NMR näytteitä vertailtaessa. Poikkeuksena tähän oli Adamsiitin arsiinihappo, jonka aromaattisille siirtymille havaittiin eroa näytteiden välillä, ja jonka tutkimuksia käsitellään erikseen seuraavassa kappaleessa.



Kuva 43: Ensimmäisten mikro-NMR näytteiden spektrit aromaattiselta sekä metanolipiikkien alueelta. Yhdisteet ovat seuraavat kohtien mukaan: A) PDCA, B) TPAO, C) TPA, D) DM-happo, E) DPAA ja F) MPAA

Puhdasaineiden siirtymien riippuvuuksien tutkiminen toteutettiin valmistamalla erilaisia näytesarjoja eri pH:ssa, joiden kokeellisia protonispektrejä käytettiin laskennallisiin menetelmiin tarvittavien spektriparametrien määrittämiseksi kunkin tutkitun yhdisteen kohdalla. Myöhemmin parametrien pohjalta kyettiin osuvasti ennustamaan yhdisteiden kemialliset siirtymät eri pH:ssa ja näin ollen luotettavasti toteamaan, löytyikö sedimenteistä valmistetuista näytteistä etsittyjä aineita vai ei.

12.2. Adamsiitin arsiinihapon puhdasainetutkimuksen

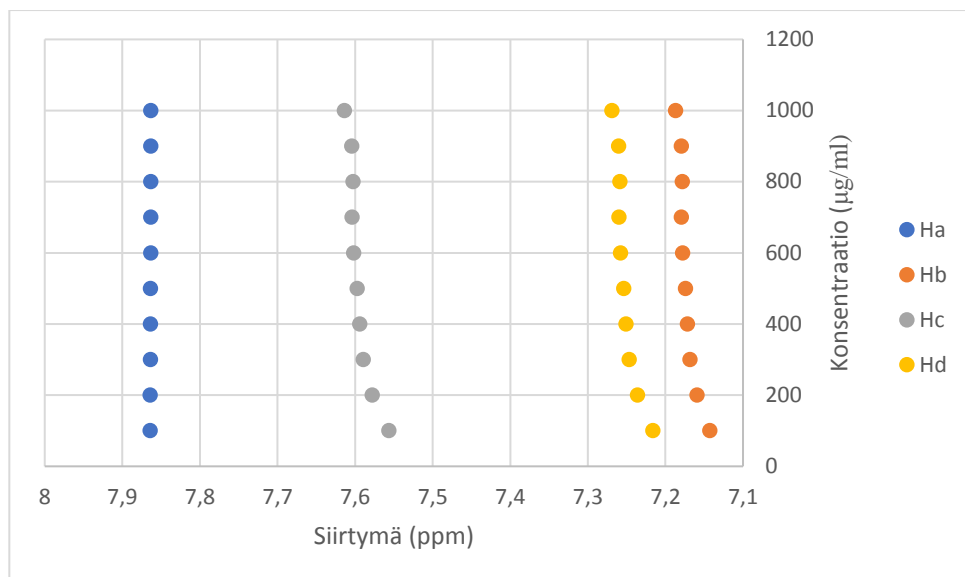
Adamsiitin arsiinihapon aromaattiset siirtymät olivat 600 μ l:n NMR-näytteen protonispektrissä muuttuneet vastaavaan mikronäytteeseen verrattuna. Eri resonanssit olivat siirtyneet eri verran ja esimerkiksi H_b protonin siirtymä oli muuttunut 0.11 ppm:n verran. Koska yhdisteen eri protonien siirtymät olivat muuttuneet eri verran, pääteltiin, että kyseessä ei ollut spektrin referointivirhe, vaan todellinen parametririippuvuus, ja lisätutkimuksia kantaliuoksen suhteen päätettiin tehdä ensin mahdollisen konsentraation myötä tapahtuvan muutoksen suhteen ja myöhemmin pH-riippuvuuteen kohdistuen.

Kantaliuoksesta valmistettiin konsentraatiosarja mittaamalla sitä sopiva määrä vialiin (Taulukko 7) ja lisäämällä $MeOH-d_4$:a, kunnes näytilavuus oli 100 μ l. Tämän jälkeen kustakin konsentraatiosarjan näytteestä valmistettiin mikro-NMR näyte, josta ajettiin 1H NMR spektri. Spekitrit iteroitiin ja tulokset koottiin excelissä kuvaajaksi (Kuva 44), jonka perusteella muutoksen todettiin olevan keskimäärin vähäistä. H_a -protonin siirtymä ei juurikaan muuttunut missään konsentraatiossa, mutta muilla protoneilla laimeammissa liuoksissa oli havaittavissa siirtymien muutosta pienempien ppm-arvojen suuntaan. Muutoksen suuruus vaihteli eri siirtymillä noin välillä 0.01-0.1 ppm. Tämä viittasi siihen, että aromaattisesta rakenteestaan huolimatta DM-hapolla ei juurikaan olisi taipumusta π -pinoutumiseen, sillä tällöin muutos olisi ollut päinvastainen. Sitä vastoin, muutos saattoi johtua konsentraation myötä vahvistuneesta vetysitoutumisesta rakenteen amino-osassa. Toisaalta samassa yhteydessä todettiin, että koska tutkittu yhdiste oli happo, saattoi muutos liittyä konsentraation sijaan pH:n muutokseen, jolloin edellä mainitut johtopäätökset eivät olisi välttämättä tosia.

Oletusta siirtymien muutoksen pH-riippuvuudesta tuki se, että vaikka riippuvuus silmämääräisesti vaikutti olevan pääosin lineaarista, eivät suoransovitukset istuneet pistejoukkoon, vaan muutoksen todettiin muistuttavan enemmänkin titrauskäyrää.

Taulukko 7: Konsentraatiosarjan valmistus DM-hapon kantaliuoksesta

c(näyte) (µg/ml)	V(DM-hapon kantaliuos) (µl)
900	90
800	80
700	70
600	60
500	50
400	40
300	30
200	20
100	10

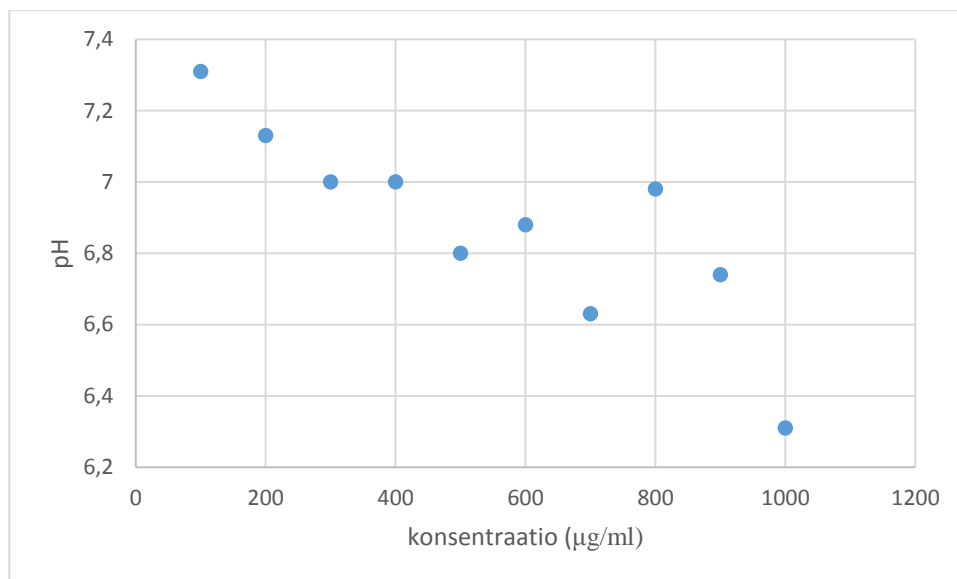


Kuva 44: Adamsiitin arsiinihapon ^1H NMR-spektrin siirtymien muutos konsentraation muuttuessa

Sarjan näytteistä päätettiin mitata lasielektrodilla pH:t, jotta voitaisiin päätellä, oliko havaittu siirtymien muutos kytköksissä yksiselitteisesti konsentraatioon vai oliko pH mahdollisesti vaikuttava tekijä (Kuva 45). Mittaustulokset on esitetty taulukossa (Taulukko 8), johon merkityt pH:t ovat ^spH arvoja, jossa s on MeOH-d_4 .

Taulukko 8: Konsentraatiosarjan näytteiden pH:t

Konsentraatiosarjan näytteen konsentraatio (µg/ml)	Mitattu pH
900	6,74
800	6,98
700	6,63
600	6,88
500	6,80
400	7,00
300	7,00
200	7,13
100	7,31
DM-hapon kantaliuos (c = 1 mg/ml)	6,31



Kuva 45: DM-hapon konsentraatiosarjan näytteiden pH konsentraation funktiona

Konsentraatiosarjan 800 µg/ml:n näytteen pH poikkesi huomattavasti muun sarjan trendistä (Kuva 45) ja sen vuoksi tuloksen epäiltiin olleen virheellinen. Koska tulosten tarkastelu suoritettiin myöhemmin kuin käytännön mittaukset, ei toistomittauksia voitu luotettavasti suorittaa. Tulosten mahdollisesta virheellisyydestä huolimatta niiden perusteella todettiin, ettei ollut mahdollista täysin varmasti sanoa, johtuiko aromaattisten protonien kemiallisten siirtymien muutos konsentraatiosta vai pH:sta, joten asiaa päätettiin tutkia lisää.

Siirtymien pH-riippuvuuden tutkiminen aloitettiin valmistamalla kantaliuoksesta näytteet pH-asteikon ääripäistä. Näin tehtiin, jotta voitiin määrittää, olivatko yhdisteen protonien siirtymät oletetun mukaisesti riippuvaisia pH:sta ja tätä kautta, oliko mielekästä valmistaa kattavampi sarja näytteitä pH-asteikon eri osista.

Ennen varsinaisten näytteiden valmistusta tehtiin hapan ja emäksinen metanoliliuos, joita lisäämällä varsinaisten näytteiden pH:t voitiin säätää halutuiksi. Tämä tehtiin mittaamalla kahteen erilliseen inserttiin 100 µl MeOH-d₄:a ja mittaamalla näytteiden pH:t, minkä jälkeen yhteen lisättiin 1 µl 25% HCl –liuosta ja toiseen 1 µl 1N NaOH:a. Molempien näytteiden pH:t mitattiin lisäyksen jälkeen (Taulukko 9).

Taulukko 9: Näytteiden pH:iden säätämiseen käytettyjen metanoliliuosten pH:t ennen ja jälkeen 25 % HCl- liuoksen tai 1N NaOH liuoksen lisäämistä

MeOH-d₄-näytteen pH ennen hapon/emäksen lisäystä	MeOH-d₄-näytteen pH hapon/emäksen lisäyksen jälkeen
7,40	0,69
7,41	13,00

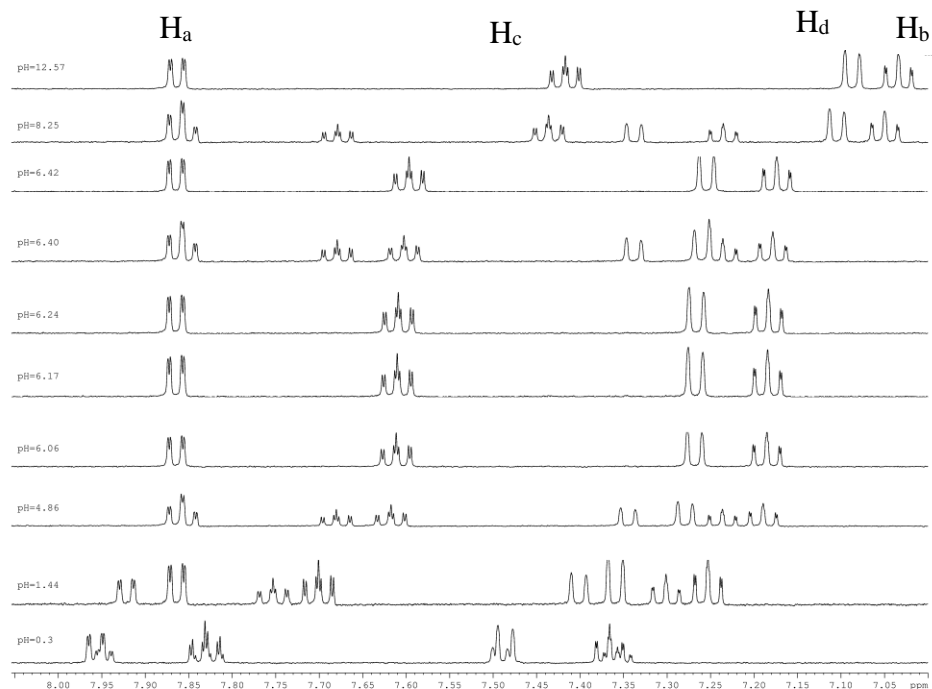
Varsinaiset DM-hapon pH-riippuvuuden tutkimiseen liittyvät näytteet valmistettiin mittaamalla vialeihin 50 µl DM-hapon kantaliuosta ja lisäämällä ensimmäiseen 50 µl hapanta ja toiseen 50 µl emäksistä metanoliliuosta. Näistä valmistettiin mikro-NMR näytteet mittaamalla 40 µl näytteitä putkiin. Jäljelle jäänyt osa näytteistä siirrettiin insertteihin pH:n mittaamista varten. Happaman näytteen pH:ksi mitattiin 0,56 ja emäksisen näytteen pH oli 9,36. Valmistettujen pH-asteikon eri päistä olevien näytteiden protonispektreistä oli mahdollista nähdä siirtymien suuruuden muuttuvan huomattavasti pH:sta riippuen, joten päätettiin valmistaa Adamsiitin arsiinihaposta kattavampi sarja näytteitä pH-asteikon eri pisteissä (Kuva 46).

DM-hapon pH-sarja valmistettiin mittaamalla insertteihin 70 μ l MeOH-d₄:a ja 1 μ l haluttua laimennossarjan liuosta. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin 30 μ l DM-hapon kantaliuosta. Kantaliuoksen riittävyys oli kuitenkin laskettu väärin sen lisäksi, että näytettä oli haihtunut ajan myötä, joten kantaliuos loppui kesken näytteiden valmistuksen ja uusi kantaliuos valmistettiin samaan tapaan kuin alkuperäinen kantaliuos. Uuden kantaliuoksen konsentraatio oli 1,0 mg/ml. Loput pH-sarjan näytteet valmistettiin muiden tavoin, mutta käyttäen uutta kantaliuosta vanhan sijaan. Valmiista näytteistä mitattiin pH (Taulukko 10) ja niistä valmistettiin mikro-NMR näytteet ja niistä ajettiin protonispektrit (Kuva 46).

Ennen mikro-NMR näytteiden valmistamista mitatuista pH:ista kävi ilmi, että Adamsiitin arsiinihapon kantaliuoksen pH vaikutti näytteiden pH:seen odotettua enemmän ja näin ollen mittauspisteitä oli pH-asteikon eri osista, muttei niin tasaisesti kuin alun perin oli laskettu. Näytteiden pH:ta päätettiin olla säätämättä, koska näyteolosuhteet haluttiin pitää vertailtavuuden vuoksi mahdollisimman lähellä sedimenttien metanoliuutteiden olosuhteita ja näytteiden tilavuuksien pienuuden vuoksi pH-sarjan näytteiden lisääminen pH:n muuttamiseksi olisi nostanut varsinaisten näytteiden vesipitoisuutta liialti.

Taulukko 10: pH-sarjan valmistus. Näytteiden valmistuksessa käytettyjä kantaliuoksia oli kaksi, joista aikaisemmin valmistettuun viitataan termillä ”vanha” ja uudempaan termillä ”uusi”

Lisätyn laimennossarjan näytteen pH	Kantaliuos (vanha/uusi)	Laskettu pH	Mitattu pH
0,02	vanha	2	0,30
0,96	vanha	3	1,44
2,11	vanha	4	4,86
3,06	uusi	5	6,24
6,81	uusi	6	6,40
8,82	uusi	8	6,06
10,96	vanha	9	6,17
11,88	uusi	10	6,42
12,94	vanha	11	8,25
13,69	vanha	12	12,57

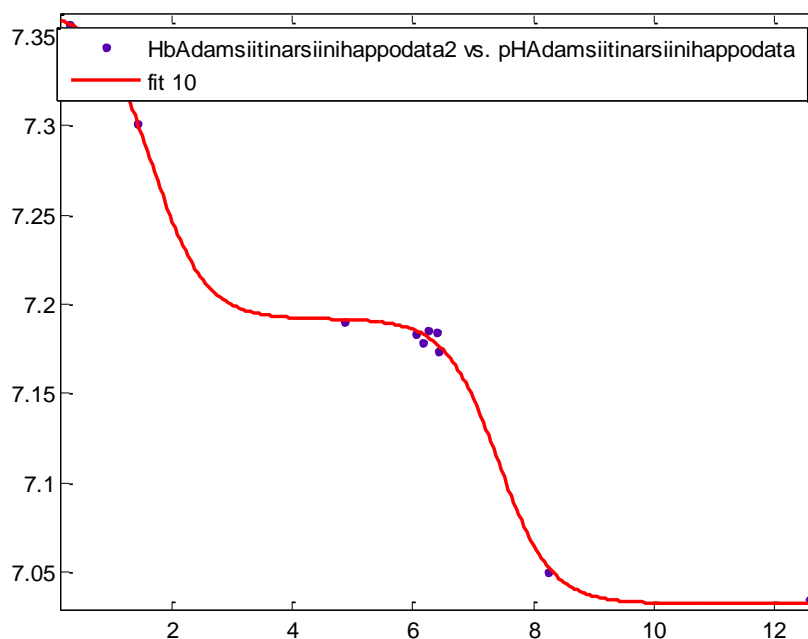


Kuva 46: Adamsiitin arsiinihapon pH-sarja. Näytteet, joissa näkyy useamman kuin yhden yhdisteen resonansseja (pH:t 0,30; 1,44; 4,86; 6,17 ja 8,25), on valmistettu vanhasta kantaliuoksesta, kun taas uudesta kantaliuoksesta valmistetuissa spektreissä havaittavissa on vain yksi yhdiste

DM-hapon pH-sarjasta havaittiin sama ilmiö kuin konsentraatiosarjan yhteydessä, sillä yhdisteen H_a -protonin siirtymä pysyi lähes samana kautta asteikon, paitsi erittäin happamalla alueella, kun taas muiden protonien siirtymissä on havaittavissa selvää muutosta pienempien arvojen suuntaan ympäristön emäksisyyden kasvaessa (Kuva 46). Tämän lisäksi uudesta kantaliuoksesta valmistetuissa näytteissä ei ollut havaittavissa reaktiotuotetta, joka vanhempaan kantaliuokseen oli muodostunut ajan kuluessa spontaanisti.

Reaktiotuotetta ja siihen liittyviä tutkimuksia käsitellään tarkemmin myöhemmissä kappaleissa. Protonien siirtymät olivat teorian mukaisia, sillä arseenihapporyhmää lähinnä sijaitsevan $H_a:n$ siirtymä muuttui eniten happamissa olosuhteissa ja aminoryhmää lähellä olevan $H_d:n$ siirtymien suurin muutos oli havaittavissa sarjan emäksisellä alueella.

Spektrit iteroitiin PERCH:llä ja selvitettyjen parametrien perusteella siirtymien ja pH:n suhteet esitettiin koordinaatistossa käyttäen Matlabia, jolla myös sovitettiin pistejoukkoihin diproottisen hapon siirtymiä kuvaavat käyrät (kappale 3.2.4., Yhtälö (28)). Esimerkkinä piirretyistä kuvaajista on esitetty kuva, jossa Adamsiitin arsiinihapon H_b -protonin siirtymä on kuvattu pH:n funktiona (Kuva 47). Muut tiedot, kuten iterointien mukaiset tarkat siirtymät ja J-kytkennät, sekä sovitusten luotettavuusrajat sekä R^2 -arvot on esitetty liitteissä 1,7 ja 8 ja muiden protonien pohjalta piirretyt kuvaajat löytyvät liitteistä 19 ja 20. Sovituksia tehdessä todettiin, että kahdessa happamimmassa näytteessä Adamsiitin arsiinihapon piikkien intensiteetti oli pienempi kuin reaktiotuotteen, kun taas muissa sarjan näytteissä tilanne oli päinvastainen. Sovituksen pohjalta selvitettiin pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot, jotka taulukoitiin muiden kantaliuosten pK_a -arvojen kanssa Taulukkoon 11.

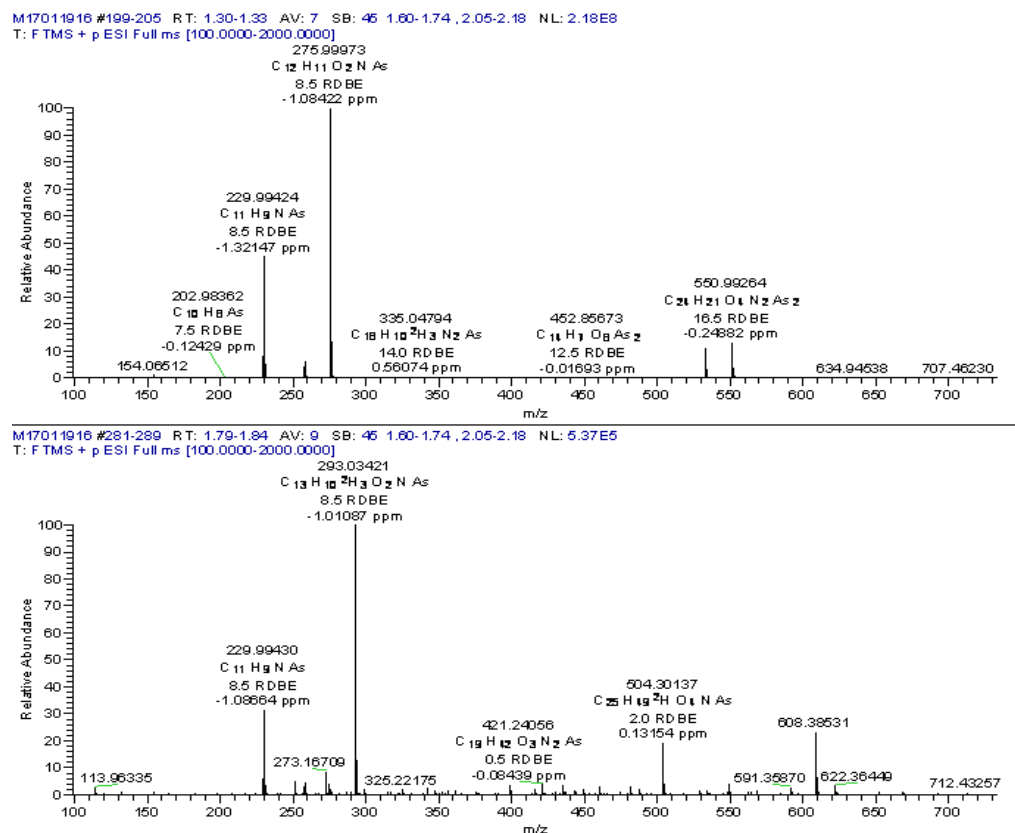


Kuva 47: Adamsiitin arsiinihapon H_b-protonin kemiallinen siirtymä pH:n funktiona

Iteroinnin pohjalta todettiin, että Adamsiitin arsiinihapon siirtymät muuttuivat pH:n funktiona, ja myös joissakin sen J-kytkennöissä tapahtui muutosta. Selkeä pH-riippuvuus havaittiin $^3J_{(HcHd)}$ ja $^3J_{(HbHa)}$ kytkennöille (Liite 20). J-kytkentöjen suurimman ja pienimmän määritellyn arvon ($^3J_{(HbHa)}$) suurin absoluuttinen ero oli 0,295 Hz. Havainnon perusteella todettiin, että DM-hapon tapauksessa mahdollista spektrikirjastoa tulevaisuudessa rakennettaessa todenmukaisia ennusteita voitaisiin simuloida lisäämällä $^3J_{(HcHd)}$ ja $^3J_{(HbHa)}$ kytkennöille pH-riippuvaisuus.

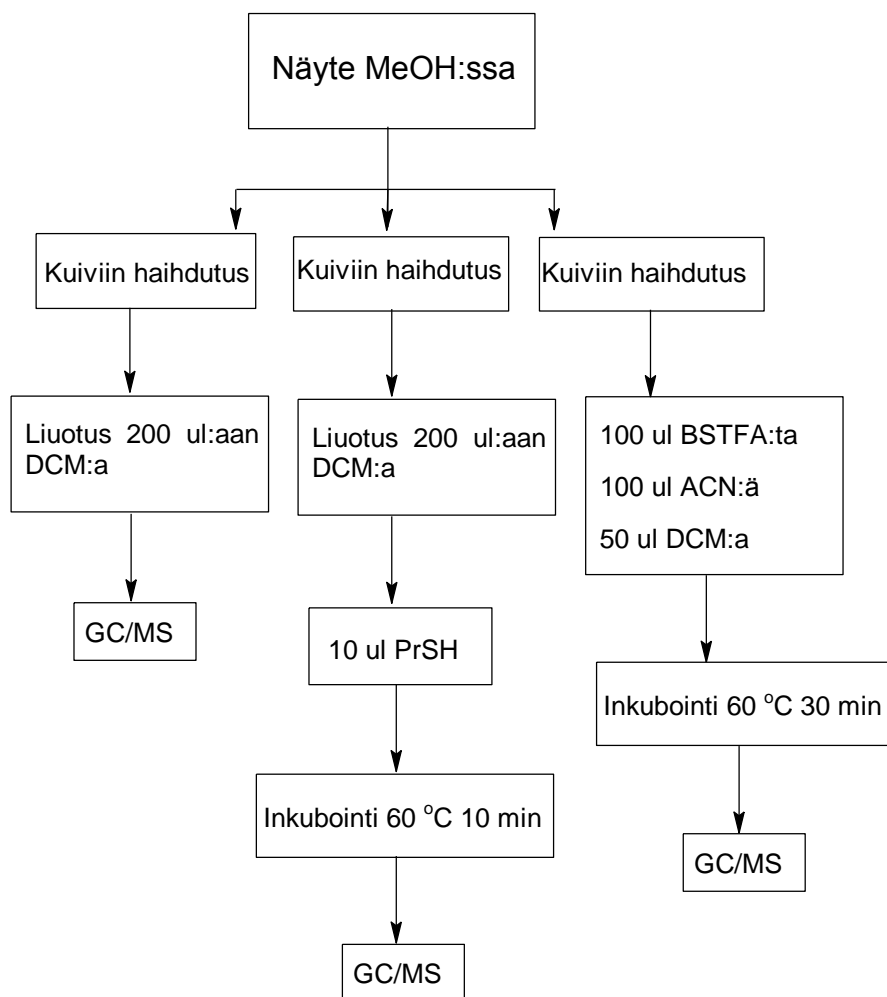
Tutkimuksia tehtiin myös nestekromatografia-massaspektrometrialla (LC-MS ja LC-MS/MS), jota varten valmistettiin DM- näytteet ionivaihdettuun veteen konsentraatiolla 20 µg/ml. Massaspektrin perusteella DM-hapon kantaliuos vaikutti sisältävän jonkinlaista

Adamsiitin arsiinihapon deuterometyloitunutta muotoa, kuten oletettiin ennen NMR:llä tehtyjen kokeiden tuloksia, sillä spektrissä oli nähtävissä piikki massalla $m/z=293$, kun itse happomuoto nähtiin massalla $m/z = 276$. Lisäksi spektrin perusteella oletettiin Adamsiitin arsiinihapon saapuvan detektorille jonkinlaisessa ryppäässä, jolla oli yksi positiivinen varaus (Kuva 48). DM-hapon Orbitrap-ajosta etsittiin dimeerien massoja, mutta niitä ei voitu nähdä (protonoituneina; **21**: $m/z = 517.263$, **22**: $m/z = 533.262$ ja **23**: $m/z = 549.261$). Mahdollisia syitä tälle saattoivat olla esimerkiksi erilaiset ongelmat ionisoitumisessa tai dimeerien mahdollinen hajoaminen DM-hapoksi kromatografian aikana.



Kuva 48: Adamsiitin arsiinihapon NMR-näytteestä valmistetusta LC-MS (Orbitrap) -näytteestä ajatut massaspektrit olennaisilta alueilta

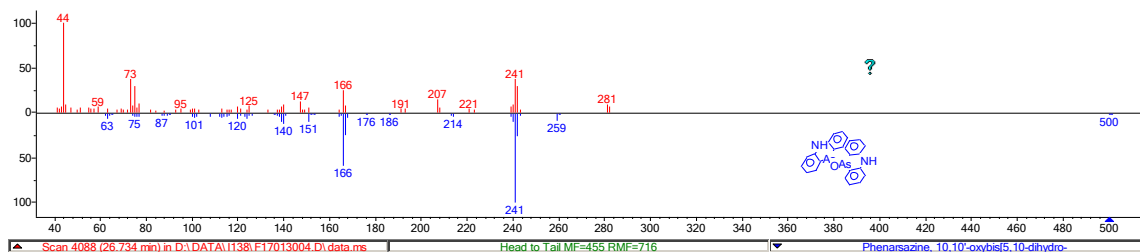
Tutkimuksia jatkettiin kaasukromatografia-massaspektrometrialla (GC-MS), jota varten valmistettiin kolme näytettä; yksi käsittelemätön ja kaksi eri tavoin derivoitua. Orbitrap näytteiden valmistusta varten vialeihin siirrettyä NMR-näytettä mitattiin 50 µl kolmeen erilliseen inserttiin, joista näytteet haihdutettiin kuiviin argonvirrassa huoneenlämmössä. Kaksi näytteistä liuotettiin 200 µl:aan dikloorimetaania ja kolmas samaan tilavuuteen asetonitriliä. Toiseen dikloorimetaaninäytteistä lisättiin 10 µl propaanitiolia ja asetonitriliin liuotettuun näytteeseen puolestaan 100 µl bis(trimetyylisilyyli)trifluoriasetamidia (BSTFA) sekä 50 µl dikloorimetaania. Propaanitiolilla derivoitua näytettä inkuboitiin 60 °C:ssa 10 minuuttia ja BSTFA:lla derivoitua inkuboitiin samassa lämpötilassa 30 minuuttia (Kuva 49).



Kuva 49: GC-MS näytteiden valmistus kaaviona

Adamsiitin arsiinihapon kantaliuoksen propyylioliderivoidussa näytteessä havaittiin piikki retentioajalla 26,781 min, joka vastasi propyylioliderivoitua Adamsiitin arsiinihappoa, mutta muita yksiselitteisiä piikkejä ei Adamsiitin arsiinihapon näytesarjassa havaittu. Käsittelemätön näyte oli tyhjä lukuun ottamatta oletettavasti liuottimesta lähtöisin olevia pieni-intensiteettisiä piikkejä. Silyloidun näytteen kromatogrammissa nähtiin piikit retentioajoilla 21.921, 22.805, 23.372 ja 26.734 min, joita ei suoraan löytynyt ohjelman kirjastosta, mutta joiden massaspektreissä voitiin nähdä Adamsiitin sukuisille yhdisteille tyypillisiä fragmentteja ($m/z = 241$ ja 166). Kyseisiä piikkejä ei nähty muiden

näytteiden eikä blank-näytteiden spektreissä. Kirjastosta (NIST) parhaimman vastaavuuden antoi piikille RT=23.372 Adamsiitin dimeeri ilman happisiltaa **21**, mutta suurimassaisten piikkien kohdalla kokeellinen spektri ei täysin vastannut kirjastospekttriä, eikä ajon skannausalue ollut riittävän suuri mahdollisen suurimassaisimman piikin sisällymiseksi kokeelliseen spektriin, eikä yksiselitteistä tunnistusta voitu sen perusteella tehdä. Tämän lisäksi RT = 26.734 nähty piikki oli erittäin pieni ja kirjastohaku tarjosi sille rakenteeksi pelkistynyttä happisillallista dimeeriä (Kuva 50). Tämänkin kohdalla oli kuitenkin samoja epävarmuustekijöitä kuin toisen mahdollisen dimeerin tunnistuksessa.

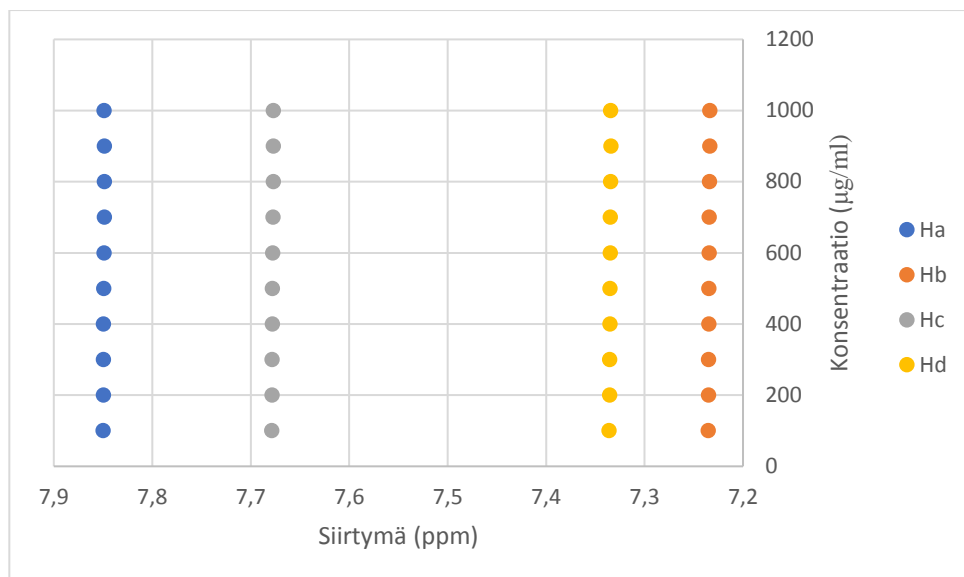


Kuva 50: Kirjastohaun ehdottama DM-hapon dimeeri happisillalla. Näytteen massaspektri punaisella ja rakenteen kirjastospektri sinisellä

12.3. Adamsiitin arsiinihapon reaktiotuotteen tutkimukset

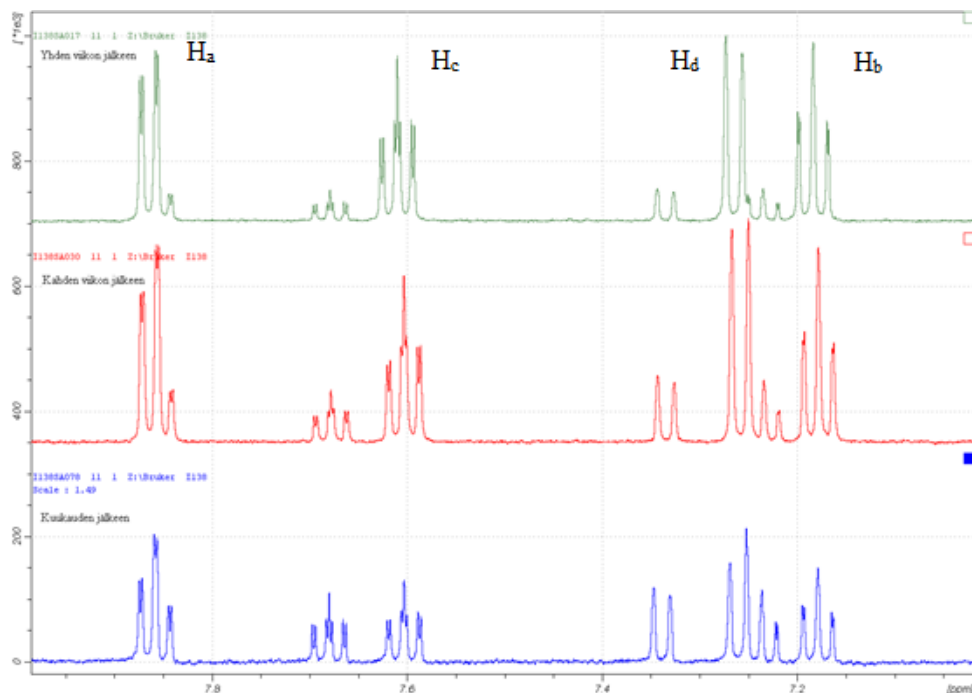
Jo Adamsiitin arsiinihapon konsentraatioriippuvuuden tutkimisen yhteydessä näytteiden todettiin sisältävän myös jotakin tuntematonta yhdistettä, jolla oli resonansseja aromaattisella alueella. Tuntemattoman yhdisteen resonanssirakenne muistutti läheisesti puhdasaineen protonien piikkejä ja sijaitsi samalla alueella, joten todettiin, että kyseessä saattoi olla esimerkiksi Adamsiitin arsiinihapon dimeeri tai jokin muu sitä rakenteellisesti muistuttava yhdiste (Kuva 53). Kyseiseen tuntemattomaan yhdisteeseen viitataan tässä tutkielmassa käsitteillä ”Adamsiitin arsiinihapon reaktiotuote” tai ”DM-hapon reaktiotuote”. Konsentraatiosarjasta tehdyn havainnon aikaan kyseisen reaktiotuotteen konsentraatio oli arviolta noin 20% tutkitun yhdisteen konsentraatiosta, eivätkä sen siirtymät juurikaan muuttuneet näyteliuoksen konsentraation kasvaessa (Kuva 51). Syynä tähän oletettiin olevan reaktiotuotteen pieni pitoisuus vahvimmissakin näytteissä, eikä havaintojen perusteella tehty päätelmiä yhdisteen konsentraatioriippuvuudesta.

Epäselvää oli, oliko liuoksessa aluksi pelkkää happomuotoa, joka sitten reagoi metanolin tai itsensä kanssa muodostaen reaktiotuotteen, vai muodostuiko reaktiotuote välittömästi hajoten sitten ajan myötä jättäen vain happomuotoa jäljelle. Kyseessä pääteltiin olevan todellisen reaktion eikä vain heikkojen vuorovaikutusten, kuten π -pinoutumisen, koska reaktiotuotteen määrä liuoksessa muuttui ilman konsentraation tai muiden olosuhteiden muutosta. Reaktiotuotteen rakenteen oletettiin olevan joko jonkinlainen DM-hapon metyloitunut muoto tai sen muodostama dimeeri. Päätelmä tehtiin sen pohjalta, että kantaliuoksessa ei ollut läsnä muita yhdisteitä kuin DM-happoa itseään ja metanolia.



Kuva 51: Adamsiitin arsiinihapon kantaliuoksessa havaitun reaktiotuotteen siirtymien muutos ^1H NMR spektrissä konsentraation muuttuessa

Adamsiitin arsiinihapon kantaliuoksesta eri aikavälein mitattuja protonispektrejä vertaamalla toisiinsa todettiin, että DM-hapon oltua viikon metanoliliuoksessa reaktiotuotteen resonanssit alkoivat näkyä protonispektrissä, minkä jälkeen puhdasaineen konsentraatio liuoksessa pienentyi ja reaktiotuotteen määrä kasvoi ajan kuluessa. Tämän lisäksi H_b -, H_c - ja H_d -protonien resonanssit olivat siirtyneet aikaisempaa alemmille siirtymille (Kuva 52). Siirtymien muutos oli pieni ja johtui oletettavasti konsentraation myötä muuttuneesta pH:n muutoksessa näytteessä.

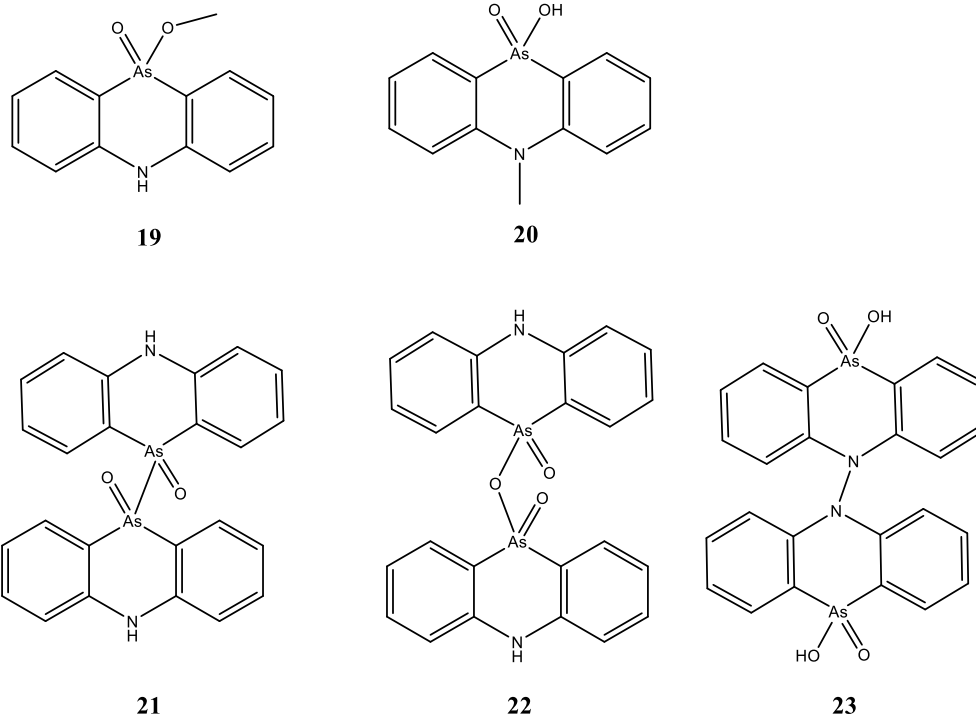


Kuva 52: Adamsiitin arsiinihapon reaktiotuotteen pitoisuuden kasvu kantaliuoksessa ajan myötä (ylin spektri viikko, keskimmäinen kaksi viikkoa ja alin kuukausi kantaliuoksen valmistuksen jälkeen)

Adamsiitin arsiinihapon pH-sarjan näytteitä käyttäen reaktiotuotteen siirtymät ja J-kytkennät iteroitiin ja sovitettiin sekä mono- että diproottisiin käyriin Matlabissa. Sovituksen tekeminen kahdella eri tavalla johtui siitä, että reaktiotuotteen siirtymien muutos oli pientä puhtaan Adamsiitin arsiinihapon siirtymien muutokseen verrattuna, eikä kumpikaan sovitukset ollut yksiselitteisesti toista parempi. Muutosten pienuuden oletettiin liittyvän reaktiotuotteen suhteelliseen pieneen pitoisuuteen sarjan spektrien mittaushetkellä. Erona sovitusten välillä oli, että diproottiselle sovitukselle ei annettu ns. luotettavuusarvoja (eng. confidence bounds), vaan niiden todettiin olevan käyrään täydellisesti istuvia, kun taas monoproottiselle sovitukselle rajat olivat pienet ja näin ollen arvojen istuvuus käyrään hyvä. Vaikka DM-hapon J-kytkentöjen muutoksen oltiin jo aikaisemmin todettu olevan pientä, päätettiin siirtymät sovittaa Matlabissa diproottisen hapon

käyrään, koska tämän todettiin vastaavan sekä todellisuutta että teoriaa monoproottisen hapon yhtälön käyttöä paremmin. Kytkennöistä laskettiin myös keskiarvot, jotka koottiin taulukkoon muiden arseeniyhdisteiden J-kytkentöjen keskiarvojen kanssa (Taulukko 14).

Liuottimena käytetyn deuterometanolin puhtaus tarkistettiin NMR:llä, eikä siitä löydetty yhdisteitä, jotka olisivat voineet ottaa osaa reaktiotuotteen syntyyn. Mahdollisen dimerisoituneen yhdisteen rakenteen pääteltiin olevan symmetrinen, koska näytteen NMR-spektrin ja ACDLabs-ohjelmistolla suoritettujen ennusteiden perusteella epäsymmetristen rakenteiden kemialliset siirtymät olisivat eronneet kokeellisista resonansseista sekä muotonsa että arvojensa puolesta. Reaktiota päätettiin tutkia valmistamalla jälleen uusi kantaliuos samaan tapaan kuin aikaisemmat kantaliuokset, mutta tällä kertaa tavalliseen metanoliin, jotta mahdollisen metyloituneen muodon metyyliipikki olisi NMR:llä havaittavissa. Uudesta kantaliuoksesta valmistettiin NMR-näyte ja sen protonispektrin perusteella näytteessä oli pelkästään puhdasta adamsiitin arsiinihappoa. Tämä varmistettiin suorittamalla näytteelle NOE-differenssikokeet, joista ensimmäisessä säteilytettiin H_a -protonia ja toisessa H_d -protonia avaruudellisesti toisiaan lähellä olevien protonien tutkimiseksi. Spektrien perusteella todettiin ”tuoreessa” näytteessä olevan ainoastaan Adamsiitin arsiinihappoa, sillä intensiteetin muutosta muualla kuin odotetuissa resonansseissa ei havaittu.



Kuva 53: Adamsiitin arsiinihapon ja metanolin välisen reaktion mahdollisten tuotteiden rakenteet **19** ja **20** sekä dimerisoitumisen mahdolliset rakenteet **11-23**

Kuukausi DM-hapon metanolikantaliuoksen valmistamisesta tehtiin liuoksesta uusi NMR-näyte, jolle suoritettiin kaksi erillistä NOE-differenssikoetta. Niistä ensimmäisessä säteilytettiin rakenteen H_a -protoneja ja toisessa H_d -protoneja, jotta magnetisaation siirtyminen havaittaisiin oletetussa metyylisingletissä. Minkään resonanssin intensiteetin kasvua ei kuitenkaan nähty spektrissä, minkä vuoksi etsityn singletin oletettiin sijaitsevan metanolin liuotinpiikin alla. Asian tarkistamiseksi valmistettiin uusi näyte kuivaamalla metanolikantaliuoksesta otettu näyte typpivirrassa huoneenlämmössä kahdesti ennen sen liuottamista deuterometanoliin ja siirtoa NMR-putkeen.

Aikaisemmassa deuteroituun metanoliin tehdyssä näytteessä oli havaittu metanolin jäämäpiikki siirtymällä 3,34 ppm. Kyseisen piikin luultiin aluksi olevan mahdollisen DM-hapon metyylijohdannaisen singletti, mutta HSQC:n perusteella todettiin resonanssia vastaavan hiilispektrin siirtymän olevan ACDLabsin siirtymän ennusteen perusteella väärä ollakseen kumpikaan oletetuista rakenteista (Kuva 53). Myöskään NOESY:ssä tai NOE-differenssikokeissa, joissa säteilytettiin MeOH-d₄:ssä olevan yhdisteen H_a- ja H_d-protoneita, ei näkynyt korrelaatiota oletetun metyylin ja aromaattisten protonien välillä. Havaintojen perusteella singletti ei siis vaikuttanut olevan osa reaktiotuotteen rakennetta. Asia varmistui, kun uuden, metanoliin alun perin valmistetun näytteen, jonka liotin oli vaihdettu, protonispektrissä ei havaittu ylimääräisiä singlettejä. Tämä tarkoitti oletetun metyylin resonanssin kadonneen ja näin ollen kyseessä olleen jäämämetanolipiikin. Tämän perusteella todettiin, että oletetut rakenteet eivät olleet mahdollisia tuotteita näytteissä ja kantaliuoksessa tapahtuneelle reaktiolle, vaan kyseessä oli oltava jonkinlainen Adamsiitin arsiinihapon dimeeri.

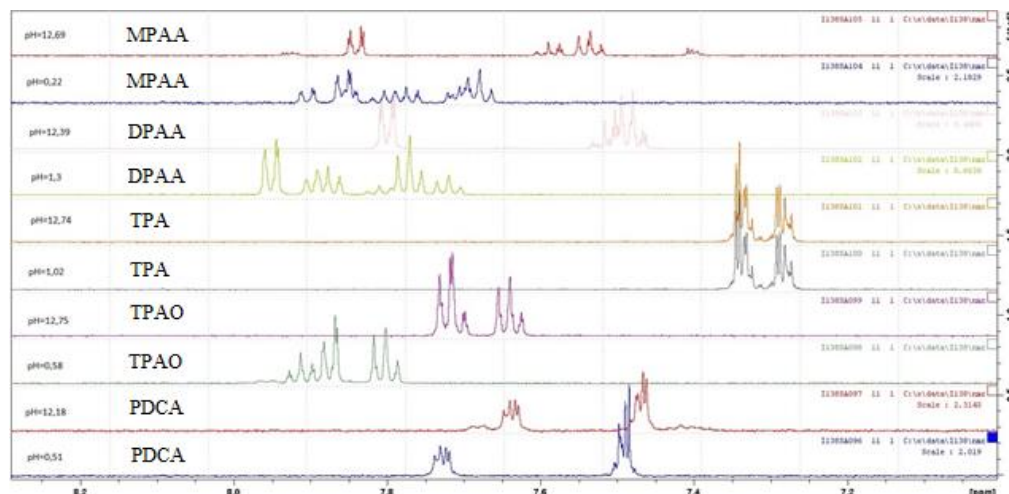
Adamsiitin arsiinihapon metanolikantaliuoksesta valmistettiin aikaisempaa konsentroidumpi ja samaan tapaan liuotinvaihdettu näyte mahdollisen dimeerin tutkimiseksi. Kantaliuosta mitattiin 600 µl NMR-putkeen ja haihdutettiin siinä kuiviin huoneenlämmössä typpivirrassa, minkä jälkeen se liuotettiin 600 µl:aan MeOH-d₄:a. Haihdutus ja liuotus toistettiin, jotta näytteestä saatiin poistettua häiritsevät deuterioimattoman metanolin liuotinpiikit ja näytteestä ajetun spektrin perusteella kyettiin aukottomasti varmistamaan, ettei näytteen spektrissä näkynyt ylimääräistä piikkiä, joka olisi voinut kuulua metyytille.

12.4. Muiden aromaattisten arseeniyhdisteiden pH-sarjojen valmistus ja tarkastelu

Koska DM-hapon tutkimuksissa siirtymien riippuvuuksien todettiin olevan kytköksissä pH:seen, eikä niinkään konsentraatioon itsessään, tutkittiin muiden arseeniyhdisteiden tapauksissa pelkästään pH-riippuvaisuuksia. Tutkimukset aloitettiin samaan tapaan kuin Adamsiitin arsiinihapon tapauksessa valmistamalla kaikista kaksi näytettä (Taulukko 11); yksi emäksisessä ja toinen happamassa liuoksessa. Näytteet valmistettiin samoin menetelmin kuin DM-hapon tapauksessa ja näytteiden pH:iden säätämiseen käytettiin samaa laimennossarjaa. Näytteistä valmistettiin mikro-NMR -näytteet, joista mitattiin protonispektrit (Kuva 54).

Taulukko 11: Arseeniyhdisteiden pH-ääripäänäytteiden ja mikro-NMR näytteiden valmistus

Tutkittu arseeniyhdiste	V(kantaliuos) (µl)	Lisätyn laimennossarjan näytteen pH	V(MeOH-d4) (µl)	pH
PDCA	1	0,02	100	0,51
PDCA	1	13,69	100	12,18
TPAO	30	0,02	70	0,58
TPAO	30	13,69	70	12,75
TPA	30	0,02	70	1,02
TPA	30	13,69	70	12,74
DPAA	20	0,02	70	1,30
DPAA	20	13,69	70	12,39
MPAA	30	0,02	70	0,22
MPAA	30	13,69	70	12,69

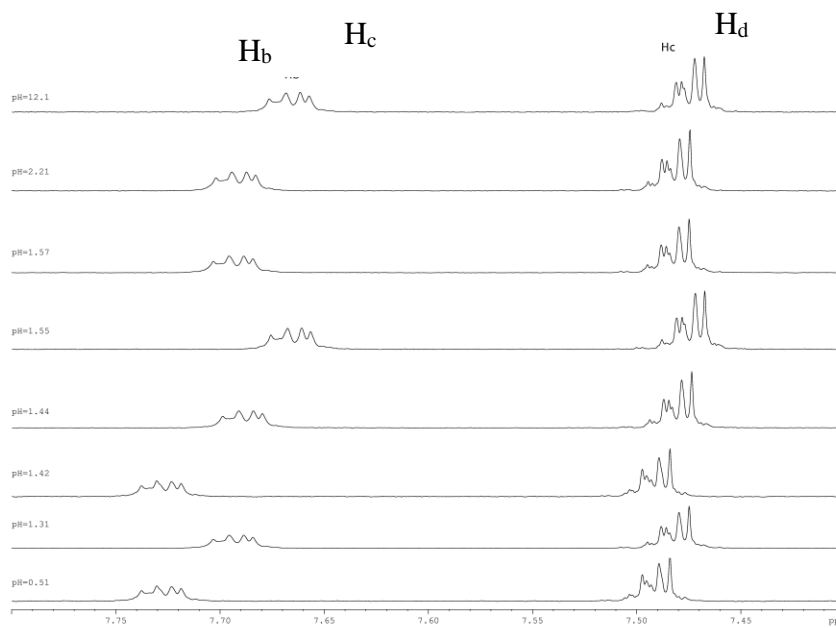


Kuva 54: Tutkittujen arseeniyhdisteiden pH-näytteet asteikon ääripäistä. Spektrit on esitetty kahden sarjoissa ja kunkin spektrin yhteyteen on merkitty, mikä yhdiste on kyseessä

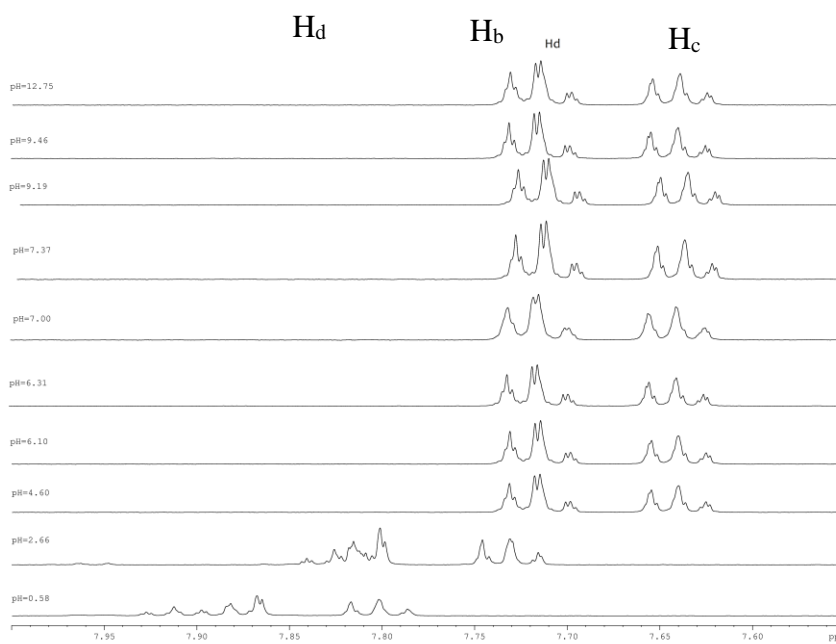
Kaikkien tutkittujen arseeniyhdisteiden, paitsi trifenyyliarseenin (TPA), protonien kemialliset siirtymät olivat nähtävästi pH-riippuvaisia. Muista yhdisteistä, lukuun ottamatta difenyylarsiinihappoa (DPAA), jonka lähtöaineen vähyyden vuoksi kantaliuoksen tilavuus ei riittänyt kattavan sarjan näytteiden valmistukseen, tehtiin pH-sarjat samaan tapaan kuin Adamsiitin arsiinihapon tapauksessa käyttäen liuottimena MeOH-d₄:a. Sarjojen näytteistä valmistettiin mikro-NMR näytteet, joista ajettiin protonispektit. Trifenyyliarseenin sarja valmistettiin jotta voitiin varmistaa että sen siirtymät pysyivät neutraalille yhdisteelle tyypillisesti samoina pH:sta riippumatta (Kuva 54). Näytteistä mitatuista pH:sta nähdään, että kuten DM-haponkin tapauksessa, sarjojen valmistaminen ei onnistunut aivan niin suoraviivaisesti kuin oli aikomus, vaan pH:t erosivat joissain tapauksissa runsaastikin lasketuista arvoista (Taulukko 12). Erityisesti fenyylidiklooriarseenin tapauksessa näytteet olivat huomattavasti odotettua happamampia, jolloin tarkasteluväli jäi pieneksi.

Taulukko 12: Arseeniyhdisteiden pH-sarjojen valmistus

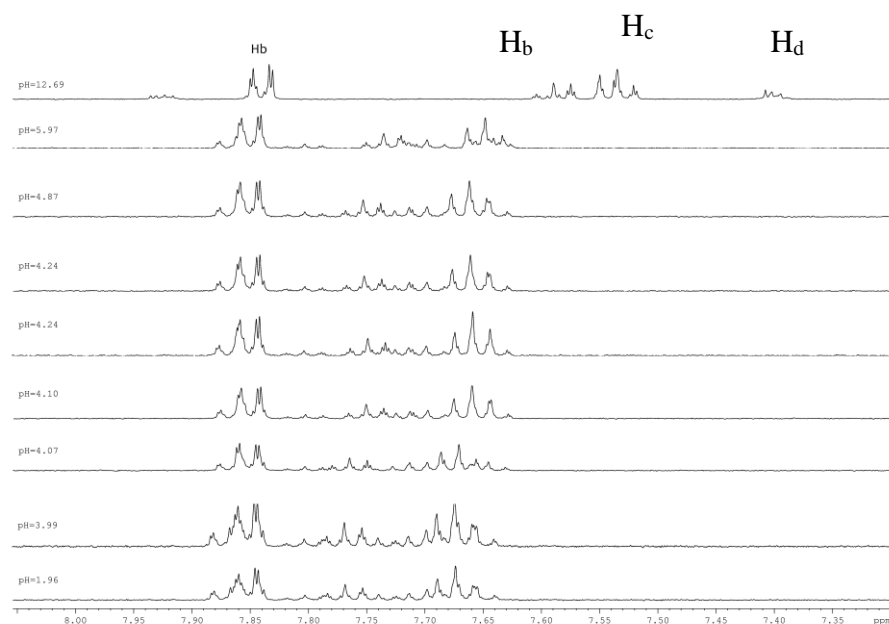
Arseeniyhdiste	Lisätyn laimennossarjan näytteen (1 µl) pH	V(MeOH-d4) (µl)	Mitattu pH	Laskettu pH
PDCA	1,44	100	1,96	3
PDCA	4,86	100	1,57	4
PDCA	6,24	100	2,15	5
PDCA	6,40	100	1,42	6
PDCA	6,06	100	1,31	8
PDCA	6,17	100	1,44	9
PDCA	6,42	100	1,55	10
PDCA	8,25	100	2,21	11
TPAO	1,44	70	2,66	3
TPAO	4,86	70	4,60	4
TPAO	6,24	70	6,10	5
TPAO	6,40	70	6,31	6
TPAO	6,06	70	9,46	8
TPAO	6,17	70	7,00	9
TPAO	6,42	70	7,37	10
TPAO	8,25	70	9,19	11
TPA	1,44	70	1,66	3
TPA	4,86	70	4,27	4
TPA	6,24	70	5,91	5
TPA	6,40	70	6,57	6
TPA	6,06	70	6,49	8
TPA	6,17	70	6,93	9
TPA	6,42	70	7,53	10
TPA	8,25	70	10,33	11
MPAA	1,44	70	1,96	3
MPAA	4,86	70	3,99	4
MPAA	6,24	70	4,10	5
MPAA	6,40	70	4,07	6
MPAA	6,06	70	4,24	8
MPAA	6,17	70	4,24	9
MPAA	6,42	70	4,87	10
MPAA	8,25	70	5,97	11



Kuva 55: Fenyylidiklooriarseenin pH-sarja



Kuva 56: Trifenyyliarseenioksidin pH-sarja



Kuva 57: Monofenyliarsiinihapon pH-sarja

Spektrit iteroitiin PERCH-ohjelmistolla. Sitä kautta saatujen arvojen perusteella piirrettiin Matlabissa siirtymien muutos pH:n funktiona ja pistejoukkoihin sovitettiin siirtymiä kuvaavat käyrät, jotka on kokonaisuudessaan esitetty liitteissä. Trifenyliarseenioksidille ja fenyylidiklooriarsiinille sovitukseen käytettiin monoprootisen ja monofenyliarsiinihapon diprootisen hapon yhtälöä. Käyrien pohjalta saatiin selville yhdisteiden laskennalliset pK_a -arvot (Taulukko 13) ja protonoidun sekä deprotonoidun muodon kemiallisten siirtymien arvot, jotka on kunkin yhdisteen osalta esitelty liitteissä. Fenyylidiklooriarseenin sarjassa (Kuva 55) yksi näyte (pH=1,96) ei istunut sarjaan ja mahdollista olikin, että sen pH oli mitattu väärin, joten se suljettiin ulos pistejoukosta sovitusta tehdessä. Myöhemmin todettiin, että ensimmäinen mittatulos (pH = 1,09), joka kyseisen näytteen pH:ta tutkittaessa oli saatu, oli todennäköisesti lähempänä totuutta kuin lopullinen tulos. Koska muiden samaan aikaan mitattujen näytteiden kohdalla pH:iden arvot olivat

toistettavasti epäuskottavia, vain pH-mittalaitteiston uudelleenkalibroinnin jälkeiset tulokset huomioitiin tulostentarkastelussa. Lisäksi saman sarjan erään näytteestä ($\text{pH} = 2,15$) ei kyetty ajamaan korkealaatuista spektriä, joten se jätettiin sarjasta pois, eikä sitä sen vuoksi ole mainittu iteroitujen arvojen taulukossa (Liite 3).

Myös sarjojen J-kytkentöjen muutosta tutkittiin ja useimmissa tapauksissa pH-riippuvuuden todettiin seuraavan Henderson-Hasselbalch käyrää. Kytkentöjen vaihteluväli mittausalueella oli pientä, muttei järjestelmällistä, joten siirtymien sovituksia ja raportointia varten J-kytkennöille laskettiin keskiarvot (Taulukko 14 ja Taulukko 13). MPAA:n kytkentöjen iteroinnissa oli ongelmia, joten luotettavien siirtymien iterointien saamiseksi J-kytkennät lukittiin sopivaksi arvioituihin arvoihin emäksisimmän näytteen ($\text{pH} = 12,69$) kytkentöjen perusteella. Lisäksi fenyylidiklooriarseenin tapauksessa näytteiden pH-jakauma oli liian kapea luotettavien johtopäätösten vetämiseksi, joten kytkentöihin ei sovitettu Matlabilla suoraa, vaan ne on esitetty pelkästään pH:n funktiona Liitteessä 31.

Monofenyyliarsiinihapossa esiintyi ajan kuluessa epäpuhtautta oletettavasti siksi, että kohdeyhdiste reagoi jollain tavoin liuoksissa olleiden muiden molekyylien tai itsensä kanssa. Tämän reaktiotuotteen J-kytkentöjä yritettiin sovittaa diproottiseen käyrään, mutta suoraa pH-riippuvuutta ei havaittu ja kytkennät ilmoitettiin keskiarvona taulukossa muiden yhdisteiden J-kytkentöjen kanssa.

Taulukko 13: Tutkittujen arseeniyhdisteiden pK_a -arvot ja niiden keskiarvot pH-sarjojen iteroitujen siirtymien Matlab-sovitusten perusteella

	TPAO	MPAA	DM-happo	PDCA
Hb (pK_{a1})	2,758	1,348	1,683	1,331
Hb (pK_{a2})	-	5,612	7,41	-
Hc (pK_{a1})	2,762	1,999	1,638	1,274
Hc (pK_{a2})	-	5,561	7,394	-
Hd (pK_{a1})	2,767	2,075	1,515	1,266
Hd (pK_{a2})	-	5,559	7,34	-
Ha (pK_{a1})	-	-	1,74	-
Ha (pK_{a2})	-	-	9,282	-
keskiarvo pK_{a1}	2,762	1,807	1,644	1,290
keskiarvo pK_{a2}	-	5,577	7,8565	-
Keskihajonta pK_{a1}	0,005	0,400	0,096	0,035
Keskihajonta pK_{a2}	-	0,030	0,951	-

Taulukko 14: Tutkittujen arseeniyhdisteiden J-kytkentöjen keskiarvot pH-sarjojen iteroitujen siirtymien perusteella

KytKentä	TPAO	MPAA:n epäpuhtaus*	DM-happo	DM-hapon reaktiotuote	PDCA*
H _c , H _c	1,303	0,027	-	-	1,286
H _c , H _b	7,749	7,912	7,180	7,173	7,617
H _b , H _c	0,605	0,297	-	-	0,671
H _c , H _d	7,578	7,394	8,486	8,539	7,475
H _b , H _b	1,67	0,165	-	-	1,489
H _b , H _d	1,220	0,257	0,980	0,977	1,235
H _c , H _a	-	-	1,551	1,535	-
H _b , H _a	-	-	7,798	7,872	-
H _d , H _a	-	-	0,494	0,512	-

* = Keskiarvoihin ei ole laskettu mukaan sarjan happaminta ja emäksisintä näytettä

Yhdisteiden pK_a-taulukossa huomioitavaa on, että Adamsiitin arsiinihapon H_a -protonin muista huomattavasti erottuvan arvon vuoksi yhdisteen pK_{a2}-arvo ja sen keskihajonta ovat hieman harhaanjohtavat. Todenmukaisemman arvon voisi olettaa saatavan, kun H_a -protonin arvo jätetään laskuista, jolloin keskiarvo on 7,38 ja keskihajonta 0,037. Lisäksi Taulukossa 12 monofenyylarsiinihapon reaktiotuotteen ja fenyyliklooriarseenin J-kytkentöjen keskiarvon laskuista on jätetty pois sarjan ääripäät, sillä niiden arvot erosivat keskiarvosta huomattavasti ja ne olisivat näin ollen johtaneet virheellisiin tuloksiin.

Monofenyyliaarsiinihappoa ja difenyyliaarsiinihappoa tutkittiin tämän lisäksi GC-MS:llä ja LC-MS/MS:llä samalla tavoin kuin Adamsiitin arsiinihapon näytteitä, mutta niiden spektreissä ei ollut nähtävissä puhtasaineiden massoista poikkeavia massoja tai ylimääräisiä piikkejä.

13. Sedimenttinäytteisiin kohdistuneet tutkimukset

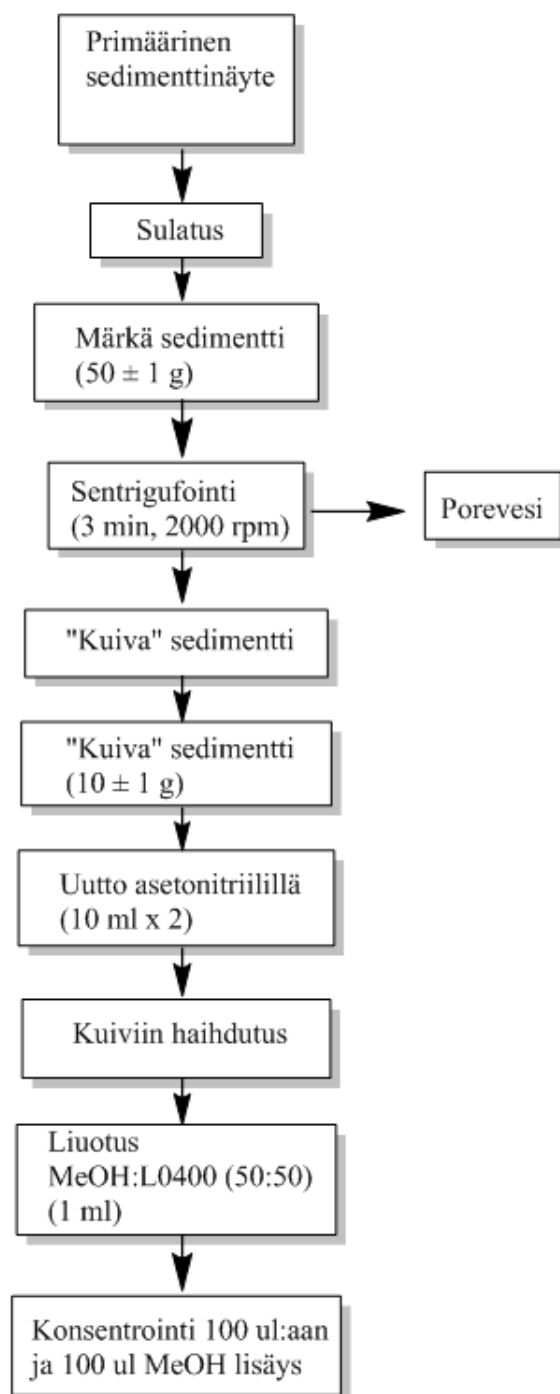
13.1. Sedimenttinäytteiden valmistus

Tutkittuja sedimenttinäytteitä oli kahdesta sedimentistä, joita nimitettiin koodeilla 2953 ja 3023 ja jotka kummatkin kävivät läpi saman näytteen esikäsittelyketjun ennen NMR-näytteiden valmistusta. Näytteiden esikäsittely ja NMR-näytteiden valmistus suoritettiin kesän 2016 aikana tässä kappaleessa kuvatulla tavalla. Esikäsittelyssä näytteet uutettiin ja uutteen muun muassa suodatettiin ja näyteliuoksen liuotin vaihdettiin ennen fraktiointia. Näytteiden fraktiointi suoritettiin Agilent 1200 HPLC-laitteistolla UV-detektorin avulla käyttäen eluenteina asetoniitriliä ja vettä. Molemmat sedimentit fraktioitiin yhteentoista osaan, joista valmistettiin mikro-NMR näytteet tarkempaa analyysia varten. Ennen tutkielman käytännön osuuden aloittamista fraktioista valmistetuista NMR-näytteistä oli ajettu ^1H -, COSY-, TOCSY- ja NOESY-spektrit. Lisäkäsittely ja uusien näytteiden valmistus muita analyysimenetelmiä varten suoritettiin tutkielman käytännön osuuden aikana.

Näytteiden valmistus aloitettiin punnitsemalla molempia sedimenteistä noin 60 gramman osuuksia putkiin, joita sentrifugoitiin kolme minuuttia 2000 rpm:n nopeudella. Sedimentistä erottuneet porevedet dekantoiitiin erillisiin astioihin ja kuivat sedimentit jaettiin noin 10 gramman painoisiin osiin. Sedimenttiä 2953 käytettiin kuivana noin 40 grammaa ja 3023:a

kuivana yhteensä noin 80 grammaa. Kuiviin sedimentteihin lisättiin 10 ml asetonitriiliä ja niitä ravisteltiin kymmenen minuuttia, minkä jälkeen näytteitä sentrifugoitiin kolme minuuttia 2000 rpm:n nopeudella ja uuttoliuotin suodatettiin Whatman 5 –suodatinpaperia käyttäen 20 ml:n mittapulloihin. Uutto ja suodastus toistettiin ja niistä eriteltyt asetonitriili-fraktiot yhdistettiin kunkin näytteen kohdalla. Näytteiden tilavuus tasattiin 20 ml:aan asetonitriilillä ja ne siirrettiin kimax-putkiin, joista ne haihdutettiin kuiviin GeneVac Ez 2:lla. Haihduttamisen jälkeen näytteet liuotettiin 1,0 ml:aan MeOH:H₂O (50:50) ja suodatettiin 0,2 µm:n Millex Smplicity Filter:llä. Näytteet konsentroitiin huoneenlämmössä heikossa typpivirrassa noin 100 µl:aan, jolloin niihin muodostui tummaa sakkaa, joka liukeni näytteeseen lisättäessä 100 µl:aa metanolia. Osaan näytteistä muodostui konsentroidin yhteydessä valkoista sakkaa, joka ei liennut metanolia lisättäessä, ja sen pääteltiin erinäisten liuotuskokeiden ja HPLC-analyysin jälkeen olevan mitä todennäköisimmin pääasiassa merivedestä lähtöisin olevia suoloja.

Näytteiden rinnalla valmistettiin myös kaksi tyhjää näytettä, joista toinen sisälsi pelkästään käytettyjä liuottimia ja joista toinen valmistettiin maanäytteestä, joka ei sisältänyt kiinnostuksen kohteena olevia aineita. Nämä tyhjät näytteet kävivät läpi saman näytteenkäsittelyn kuin varsinaiset näytteet.

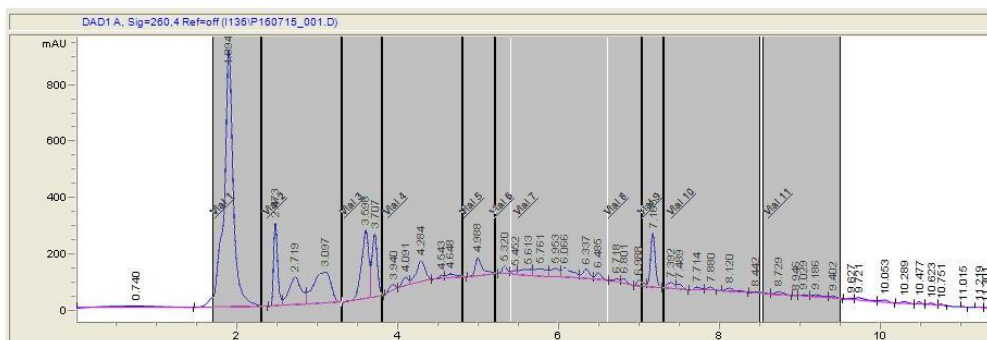


Kuva 58: Sedimenttinäytteiden valmistus

Konsentroinnin jälkeen näytteet rikastettiin fraktioimalla ne Agilent 1200 HPLC-laitteella käyttäen vesi-asetonitriligradienttia (Taulukko 15). Detektorina käytettiin UV-lamppua aallonpituudella 260 nm. Molemmista sedimenteistä valmistetuille näytteille käytettiin samaa gradienttia, mutta molemmille kehitettiin omat fraktiointimenetelmänsä, joissa fraktiot kerättiin eri aikavälein (Kuva 59 ja Taulukko 16, Kuva 60 ja Taulukko 17). Kaikki fraktiot kerättiin talteen, vaikka fraktiointi optimoitiinkin vain muutamalle halutulle yhdisteelle, joiden retentioajat olivat sedimentissä 3023 noin 5,13 minuuttia ja sedimentissä 2953 noin 4,98 minuuttia sekä 7,15 minuuttia.

Taulukko 15: Sedimenttinäytteiden HPLC.fraktiointiin käytetty vesi-asetonitriligradientti

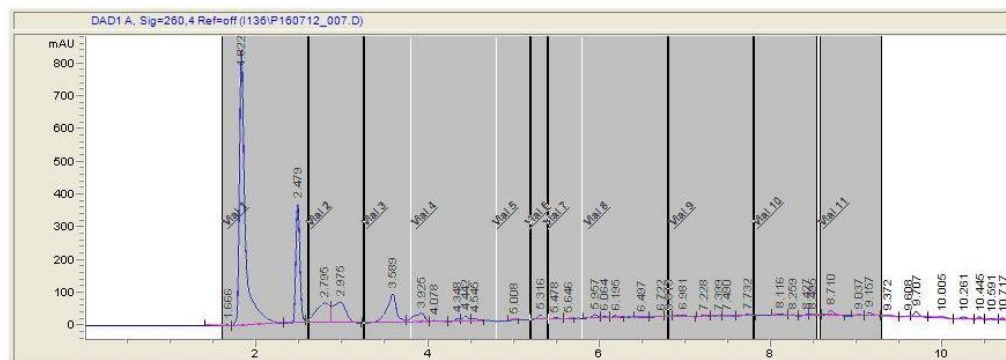
Aika (min)	L0400 (%)	Asetonitrili (%)	Flow (ml/min)
0,0	95,0	5,0	1,0
8,0	0,0	100,0	1,0
9,0	0,0	100,0	1,0
9,1	95,0	5,0	1,0
13,0	95,0	5,0	1,0



Kuva 59: Sedimentin 2953 fraktioinnin kromatogrammi

Taulukko 16: Sedimentin 2953 fraktioiden keräysajat

Fraktio	Aikaväli (min)
1	1.70-2.30
2	2.31-3.30
3	3.31-3.80
4	3.81-4.80
5	4.81-5.20
6	5.21-5.40
7	5.41-6.60
8	6.61-7.02
9	7.03-7.30
10	7.31-8.50
11	8.51-9.50



Kuva 60: Sedimentin 3023 fraktioinnin kromatogrammi.

Taulukko 17: Sedimentin 3023 fraktioiden keräysajat.

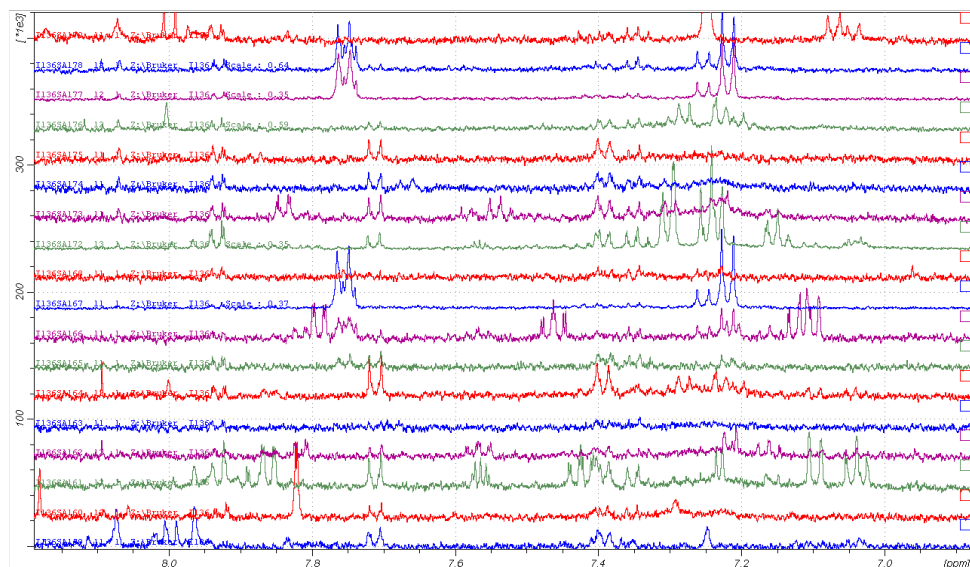
Fraktio	Aikaväli (min)
1	1.60-2.60
2	2.61-3.25
3	3.26-3.80
4	3.81-4.80
5	4.80-5.20
6	5.21-5.40
7	5.40-5.80
8	5.81-6.80
9	6.81-7.80
10	7.81-8.55
11	8.58-9.30

Rikastamisen jälkeen fraktiot yhdistettiin numeron mukaan sedimenteittään. Näin saaduista yhdistetyistä näytteistä suurin osa haihdutettiin kuiviin huoneenlämmössä heikossa typpivirrassa, mutta näytteille, joiden tilavuus oli huomattavasti suurempi, osa haihduttamisesta suoritettiin TurboVap LV:llä (45 °C, 5 psi). Kuiviin haihdutetut näytteet liuotettiin 45 µl:aan deuterioitua metanolia ja siirrettiin mikro-NMR näyteputkiin.

13.2. Sedimenttinäytteiden tutkiminen

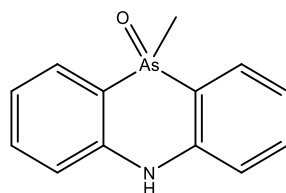
13.2.1. Aromaattisten arseeniyhdisteiden etsiminen sedimenttinäytteistä NMR-spektroskopiolla

Sedimenttien fraktioita seulottiin protonispektrien perusteella (Kuva 61) ja useissa fraktioissa todettiin näkyvän samoja aromaattisia rakenteita. Rakenteet, joita havaittiin suurimmassa osassa fraktioista, saattoivat olla lähtöisin jostain esikäsittelyn vaiheesta tai esimerkiksi jonkinlaisia lisäaineita käytetyistä liuottimista, kuten asetonitrilistä. Spektrejä vertaamalla kantaliuosten pH-sarjoihin (Kuva 46, Kuva 55, Kuva 56 ja Kuva 57) todettiin sedimentin 3023 fraktion 5 sisältävän monofenyylarsiinihappoa (**18**). Samaan tapaan todettiin sedimentin 2953 fraktioissa 4 ja 7 sekä sedimentin 3023 fraktiossa 4 olevan Adamsiitin arsiinihappoa (**16**).



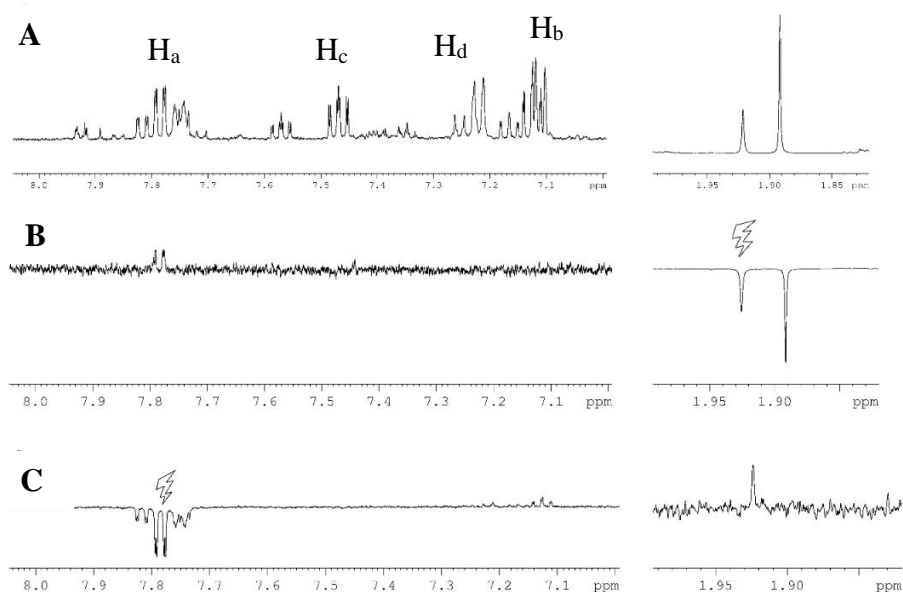
Kuva 61: Sedimentinäytteiden protonispektrit allekkain vertailua varten. Sedimentin 2953 fraktion 10 sekä sedimentin 3023 fraktioiden 4 ja 8-10 näytteiden intensiteettiä on pienennetty kuvan selkeyttämiseksi

Sedimentinäytteitä tutkittaessa erityistä huomiota kiinnitettiin sedimentin 2953 fraktiosta 9 valmistettuun näytteeseen, jossa epäiltiin NMR:n ja massaspektrometrian perusteella olevan Adamsiitin arsiinihapon metyloitunutta muotoa (Kuva 62, **24**). Kyseisestä näytteestä ajettiin uusi protonispektri, COSY-, TOCSY- ja useita NOE-differenssi-kokeita. NOE-differenssikokeita suoritettiin säteilyttämällä sekä H_a - (Kuva 63) että H_d -protonia (Kuva 64), jolloin todettiin H_a -protonin ja metyylin protonien olevan avaruudellisesti lähellä toisiaan. H_d -protonia säteilytettäessä NOE-differenssikokeessa ei havaittu muutosta metyyliin intensiteetissä, joten niiden pääteltiin olevan avaruudellisesti liian kaukana toisistaan, jotta metyyli olisi ollut kiinni Adamsiitin arsiinihapon tyypessä. Havainto varmistettiin uusimalla koe, mutta säteilyttämällä tällä kertaa metyylin singlettä, jolloin H_a -protonin resonanssi voimistui odotetusti ja avaruudellinen läheisyys voitiin varmistaa (Kuva 63 ja Kuva 64).

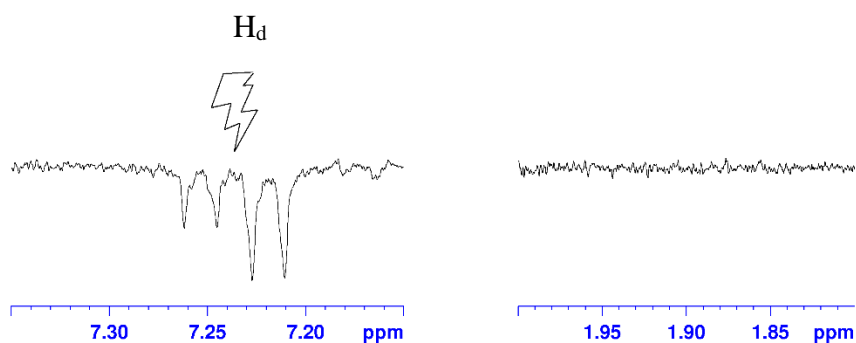


24

Kuva 62: Sedimenttinäytteessä olleen metyloituneen Adamsiitin arsiinihapon rakenne

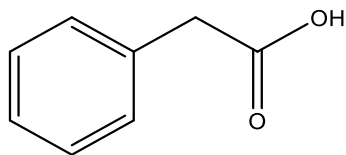


Kuva 63: Metyloituneen Adamsiitin arsiinihapon (24) sisältämälle sedimenttinäytteelle suoritettuja NOE-differenssikokeita verrattuna yhdisteen tavalliseen protonispektriin. Kohdassa A on esitetty sedimenttiuutteen fraktion tavallinen ^1H NMR spektri, kohdassa B epäiltyä metyyliipikkiä on säteilytetty, jolloin H_a protonissa on havaittu avaruudellinen läheisyys signaalin intensiteetin NOE-vahvistumisena, ja kohdassa C H_a protonia on säteilytetty, jolloin avaruudellinen läheisyys todennettiin B kohdan tapaan päinvastaisesti metyyliipiikin kasvuna



Kuva 64: Metyloituneen Adamsiitin arsiinihapon (**24**) sisältämälle sedimenttinäytteelle suoritettu NOE-differenssikoe, jossa H_d protonin resonanssi saturoitiin säteilyttämällä. Metyyliipiikin alueella ei nähty muutosta, eli osoittaa että ao. metyyliryhmä ei ole avaruudellisesti lähellä H_d protonia

Adamsiitin arsiinihapon lisäksi oltiin kiinnostuneita yhdisteestä, jota protonispektrin perusteella oli huomattava määrä sedimentin 3023 fraktiossa 4. Yhdisteen epäiltiin olevan 2-fenyylietikkahappoa (Kuva 65, **25**), joten vastaava kantaliuos valmistettiin referenssinäytteen tekemistä varten. 2-fenyylietikkahappoa punnittiin vialiin 11,5 mg ja liuotettiin 1150 μ l:aan MeOH- d_4 :a. Kantaliuoksesta valmistettiin NMR-näytteen valmistusta varten väliliuos laimentamalla näytettä deuterometanolilla, minkä jälkeen varsinainen NMR-näyte tehtiin. Alkuperäisen protonispektrin perusteella sedimentissä havaitut resonanssit eivät käyneet yksiin puhtasaineen siirtymien kanssa, joten yhdisteelle päätettiin tehdä pH-sarja laajempien, ja näin ollen luotettavammin sovellettavien, tulosten saamiseksi.



25

Kuva 65: 2-fenyylietikkahapon rakenne

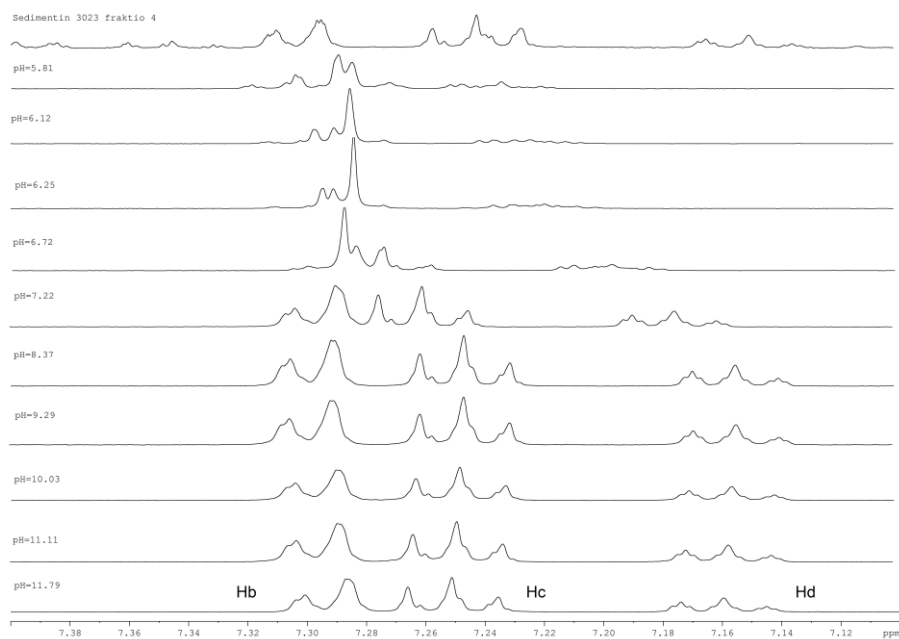
Koska näytteen pH oli lievästi hapan, eikä sitä haluttu säätää erittäin happamaksi vesipiikin välttämiseksi, valmistettiin titrausta varten kaksi NaOH-liuosta eri konsentraatioilla, joita lisäämällä näytteen pH:ta saatiin säädeltä. Vahvempi liuos valmistettiin mittaamalla vialiin 900 µl ionivaihdettua vettä ja lisäämällä siihen 100 µl 1N NaOH-liuosta. Laimeampi liuos valmistettiin vastaavasti, mutta 1N NaOH:n sijaan vialiin lisättiin 100 µl juuri valmistettua vahvempaa NaOH-liuosta.

Titraus suoritettiin lisäämällä näyteputkeen vähitellen NaOH-liuoksia, kunnes saavutettiin haluttu pH ja kirjaamalla sitten tulos ylös ennen protonispektrin ajamista. Kunkin mittapisteen välillä NaOH-liuoksia lisättiin, kunnes pH saatiin nostettua tarpeeksi korkeaksi, minkä jälkeen kustakin pisteestä mitattiin uusi protonispektri ennen titrauksen jatkamista. Titrauksen aikana näytteeseen lisätyn NaOH-liuoksen määrä sekä näytteen pH kussakin pisteessä on esitetty taulukossa (Taulukko 18). Taulukossa ”V(10% 1N NaOH)” ja ”V(1% 1N NaOH)” viittavat edellisen pisteen jälkeen lisätyn NaOH-liuoksen tilavuuteen.

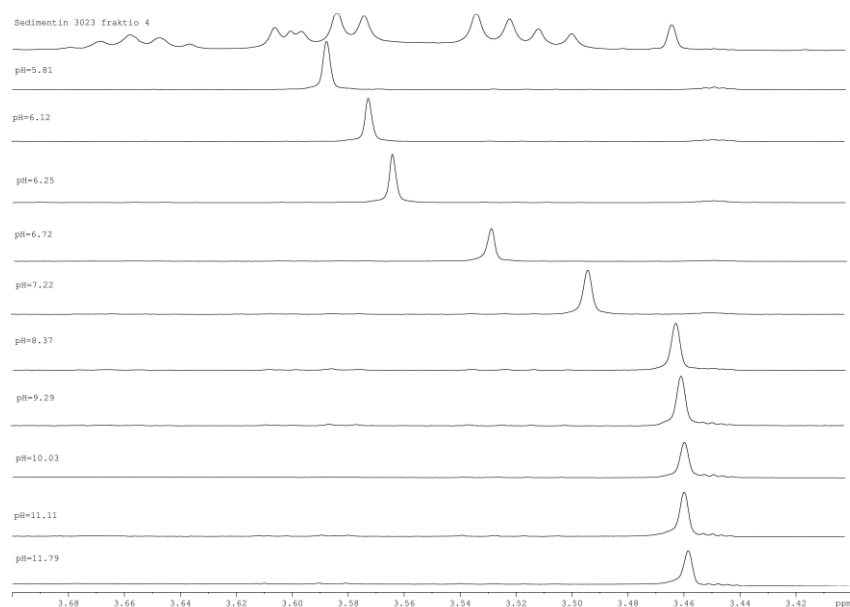
Titraussarjan protonispektreissä yhdisteen siirtymien pH-riippuvuus nähdään selvästi (Kuva 66 ja Kuva 67). Riippuvuus oli odotetusti monoproottisen hapon Henderson-Hasselbalch-yhtälön mukainen ja spektri iteroitiin PERCH:llä, minkä jälkeen tuloksiin sovitettiin käyrä Matlabissa (Liitteet 32 ja 33). Titraussarjan spektrien perusteella todettiin näytteen sedimentin 3023 fraktion 4 sisältävän 2-fenyylitikkahappoa, kuten aikaisemmin oli oletettu. Asiaa tarkasteltiin vielä myöhemmin Orbitrap-ajojen yhteydessä (Taulukko 20).

Taulukko 18: 2-fenyylitikkahapon titraus NMR-putkessa

V(10% 1N NaOH) (µl)	V(1% 1N NaOH) (µl)	pH
-	-	5,81
1	1	6,12
-	5	6,25
2	-	6,72
2	-	7,22
2	-	8,37
1	-	9,29
1	5	10,03
2	-	11,11
5	-	11,79



Kuva 66: 2-Fenyylietikkahapon titrauksen protonispektrien aromaattinen alue. Sarjan emäksisimmän näytteen, eli kuvassa alimpana esitettyyn, spektriin on merkattu piikkien assignointi. Ylinnä näytteen sedimentin 3023 fraktion 4 spektrin aromaattisen alueen levitys; huomaa vastaavuus 2-fenyylietikkahapon pH-sarjan emäksisten näytteiden spektrien kanssa



Kuva 67: 2-Fenyylietikkahapon titrauksen protonispektrien alifaattinen alue CH_2 -singlettiresonanssin ympäristöstä. Ylinnä näytteen sedimentin 3023 fraktion 4 spektrin alifaattisen alueen levitys; huomaa siirtymällä δ_{H} 2.46 olevan singletin vastaavuus 2-fenyylietikkahapon pH-sarjan emäksisten näytteiden spektrien kanssa

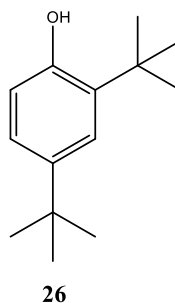
13.2.2. Aromaattisten yhdisteiden etsiminen sedimenttinäytteistä kaasukromatografia-massaspektrometriallla

Parhaiten kaikkia sedimenttinäytteissä havaittuja aromaattisia yhdisteitä edustaviksi fraktioiksi valittiin sedimentin 2953 fraktiot 5 ja 10 sekä sedimentin 3023 fraktiot 4 ja 5. Valittujen näytteiden protonispektrien pohjalta näytteissä todettiin kootusti esiintyvän kaikki muissakin fraktioissa havaitut yhdisteet ja näytteiden pitoisuuksien todettiin olevan tarpeeksi suuret, jotta niitä pystyttiin käsittelemään ja analysoimaan. Valitut näytteet siirrettiin sentrifugoimalla total recovery –vialeihin ja putket huuhdeltiin kolmesti 30 µl:lla MeOH:a, joka yhdistettiin näytteisiin. Näytteet käytettiin kokonaan jakamalla ne kolmeen osaan insertteihin, jolloin näytetilavuudeksi saatiin noin 40 µl. Alkuperäiset vialit huuhdeltiin 30 µl:lla MeOH:a, joka jaettiin kolmeen osaan ja yhdistettiin uusiin näytteisiin. Tämän jälkeen näytteet valmistettiin samaan tapaan kuin Adamsiitin arsiinihapon GC-MS –näytteet (Kuva 49). Lisäksi näytteiden kanssa samaan tapaan valmistettiin kaksi derivoitua tyhjää näytettä, joiden avulla pystyttiin rajoittamaan tulosten tulkintaa näkemällä muun muassa reagenssien epäpuhtauksia ja muuta taustaa.

Sedimenttinäytteiden kromatogrammeista etsittiin erilaisia fragmentteja sen perusteella, minkälaisia yhdisteitä sedimenteissä epäiltiin olevan. Yksittäisillä massoilla etsittiin esimerkiksi erilaisia Adamsiitin johdannaisia sekä yleisimpiä PAH- ja POP-yhdisteitä. Näihin lukeutuivat muun muassa antraseeni, fluoranteeni, fluoreeni, kryseeni ja fenantreeni sekä yhdisteryhminä erilaiset polyklooratut bis-fenyyli, polyklooratut dibentsofuraanit sekä polyklooratut dibentsodioksiinit, sekä esimerkiksi DDT ja sen hajoamistuotteet. Mitään edellä mainituista yhdisteistä ei kuitenkaan GC-MS:n perusteella löydetty mistään sedimenttinäytteestä. Osasyynä tähän todettiin olevan, että kaikki etsityt aineet eivät olisi

kunnolla derivoituneet käytetyillä reagensseilla, tai muuten olisi olleet havaittavissa kaasukromatografialla. Etsityistä ryhmistä ainoastaan PAH- ja POP-yhdisteiden suhteen voitiin yksiselitteisesti sanoa, etteivät sedimentit niitä sisältäneet. Johtopäätös tehtiin sen perusteella, että käytetyillä menetelmillä ja NMR:llä määriteltujen pitoisuuksien mukaan kyseisiin yhdisteryhmiin kuuluvien aineiden olisi tullut olla havaittavissa kaasukromatografian avulla.

Toistuvasti kaikista käsittelemättömistä sedimenttinäytteistä löydettiin retentioajalla 15,5 min piikki, jonka massaspektrissä suurin $m/z = 206$ ja intensiivisin piikki oli $m/z = 191$. NIST-kirjastohaun perusteella oletettu rakenne oli trisubstituoitu bentseeni (Kuva 68). Tuloksia verrattiin kesällä 2016 sedimenttinäytteistä ajettuihin LC-MS-tuloksiin, joissa vastaavaa rakennetta ei oltu havaittu. Tämä voi toisaalta mahdollisesti johtua myös siitä, että ehdotettu rakenne on hyvin pieni ja sen oletettu retentioaika LC:ssä saattaa olla niin lyhyt, että se jää nestekromatogrammissa liuotinpiikin alle, eikä sitä tämän vuoksi voida nähdä. Kirjaston ehdottaman rakenteen perusteella ennustettiin yhdisteelle siirtymät, joita verrattiin kokeellisiin NMR-spektreihin. Sedimenttinäytteiden spektreissä ei kuitenkaan havaittu singlettiä, jonka yksi aromaattisen renkaan protoneista olisi pitänyt tuottaa, joten yhdisteen läsnäoloa ei voitu täysin epäilyksettä varmistaa.



Kuva 68: GC-MS:lla sedimenttinäytteissä havaittu aromaattisen yhdisteen rakenne

13.2.3. Aromaattisten yhdisteiden seulominen sedimenttinäytteistä nestekromatografia-massaspektrometriallla

Aikaisemmin NMR:n perusteella näytteissä havaitun 2-fenyylitikkahapon (25) läsnäolo yritettiin vahvistaa nestekromatografialla valmistamalla siitä referenssinäyte, jonka avulla yhdisteen havaittavuutta menetelmällä tutkittiin. Referenssinäytteen perusteella todettiin, ettei 2-fenyylitikkahappo voitu nähdä LC-MS:llä positiivisella ionisaatiolla, joten ajoja yritettiin suorittaa sen sijaan negatiivisella ionisaatiolla. Laiteongelmien vuoksi yrityksessä ei kuitenkaan onnistuttu, joten näytteet päätettiin ajaa Orbitrapilla (LC-MS ja LC-MS/MS).

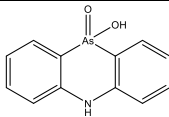
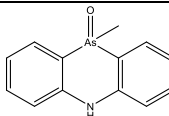
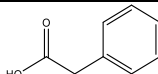
Derivoimattomista GC-MS näytteistä tehtiin uudet näytteet Orbitrap-ajoja varten haihuttamalla näytteet kuiviin huoneenlämmössä typpivirrassa, minkä jälkeen näytteet liuotettiin 200 µl:aan ionivaihdettua vettä. Ajoja varten valmistettiin myös uusi 2-fenyylitikkahappokantaliuos punnitsemalla 13,7 mg ainetta vialiin ja liuottamalla se 1370 µl:aan metanolia. Kantaliuoksesta tehtiin kaksi standardia mittaamalla sopiva määrä 2-fenyylitikkahapon kantaliuosta vialiin ja lisäämällä sitten ionivaihdettua vettä tilavuuden täyttämiseksi 1000 µl:aan. Standardien konsentraatiot olivat 100 µg/ml ja 50 µg/ml. Standardien ajoissa ainoat deprotonoituneen yhdisteen massan mukaiset ($m/z = 135.045$) piikit havaittiin retentioajalla 2,10 minuuttia, jolloin piikkien intensiteetti oli noin tasoa 10^4 , eli hyvin heikko. Samalla kohtaa piikki saatettiin havaita sedimentin 3023 fraktiossa 4, jossa 2-fenyylitikkahappoa NMR:n perusteella olisi pitänyt olla, mutta piikin intensiteetti oli vain tasoa 10^2 . Tämän perusteella todettiin, että ainakaan käytetyillä metodeilla 2-fenyylitikkahappoa ei voitu havaita näytteissä luotettavasti massaspektrissä.

Orbitrap ajossa seulottiin myös arseeniyhdisteitä, joista osan läsnäolo oli jo aikaisemmin todettu NMR:n ja LC-MS:n perusteella. Näytteille ajettiin MS/MS valituilla massoilla ($m/z = 203, 261, 274$ ja 276) ja ajojen perusteella havaittu fragmentaatio varmisti näytteissä olleet rakenteet. Törmäytykseen ja niiden yhteydessä ajettuihin yleisiin skannauksiin (eng. full scan) liittyvät tiedot on esitelty Taulukossa 20. Orbitrap-ajoissa näytteissä havaitut aromaattisten arseeniyhdisteet sekä mahdolliset jäämät 1-fenyylitikkahappoa on esitetty Taulukoissa 21-24, johon on kerätty seulonnassa käytetyt ionisoituneet massat sekä positiivisen että negatiivisen ionisaation ajoissa, etsittyjen yhdisteiden rakenteet sekä niiden piikkien retentioajat. Negatiivisella polaarisuudella näytteitä ajettaessa käytettiin samaa kolonnia kuin positiivisella puolella ja metodia I138-OTMS+OTMS2-135-neg, joka vastasi positiivista metodia lukuun ottamatta skannausaluetta (eng. scan range), joka oli laajempi ($m/z = 70\ 800$).

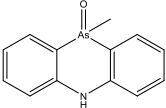
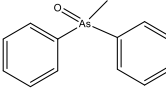
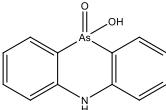
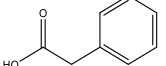
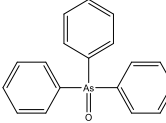
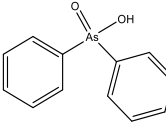
Taulukko 19: Sedimenttien fraktioiden Orbtrapilla ajetun MS/MS:n ja sen yhteydessä ajetun yleisen skannauksen tiedot

Metodin nimi	I138-OTMS-276-274-261-203-pos																				
Polaarisuus	Positiivinen																				
Eluentit	A=0,1 % HCOOH ionivaihdetussa vedessä B=0,1% HCOOH asetonitrilissä																				
Virtaus	0,5 ml/min																				
Kolonni	C18, 50x2.1mm, 1.7 µm, LC-MS093																				
Gradientti	<table><tr><th>Eluentti</th><th>%</th><th>Aika (Min)</th></tr><tr><td>B</td><td>5</td><td>0</td></tr><tr><td>B</td><td>100</td><td>7</td></tr><tr><td>B</td><td>100</td><td>8</td></tr><tr><td>B</td><td>5</td><td>8.1</td></tr><tr><td>B</td><td>5</td><td>10</td></tr></table>			Eluentti	%	Aika (Min)	B	5	0	B	100	7	B	100	8	B	5	8.1	B	5	10
Eluentti	%	Aika (Min)																			
B	5	0																			
B	100	7																			
B	100	8																			
B	5	8.1																			
B	5	10																			
Skannausalue (Scan range)	70-350																				
Resoluutio	120 000																				
RF lens (%)	60																				
AGC target	Full scan: 2.0E5, MS/MS: 5.0E4																				
Microscans	1																				
MS/MS törmäytykset	<table><tr><th>m/z</th><th>Aika (min)</th></tr><tr><td>203</td><td>0-1</td></tr><tr><td>274</td><td>1-1.6</td></tr><tr><td>276</td><td>1-1.6</td></tr><tr><td>261</td><td>1.6-7</td></tr></table>			m/z	Aika (min)	203	0-1	274	1-1.6	276	1-1.6	261	1.6-7								
m/z	Aika (min)																				
203	0-1																				
274	1-1.6																				
276	1-1.6																				
261	1.6-7																				

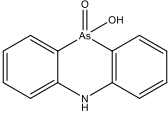
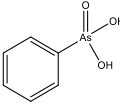
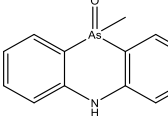
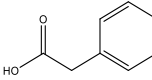
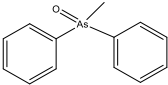
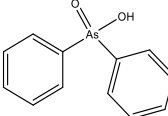
Taulukko 20: Sedimenttinäytteen R2953 fraktion 5 Orbitrap -ajoissa havaitut aromaattiset arseeniyhdisteet sekä 2-fenyylietikkahappo, havaitut massat positiivisella ja negatiivisella ionisoinnin tuottamalla polarisuudella mitattuina

<i>m/z</i> (polarisuus: positiivinen)	<i>m/z</i> (polarisuus: negatiivinen)	Etsitty yhdiste	Etsityn yhdisteen ionisoitumaton rakenne	RT (min) (positiivisella ionisaatiolla / negatiivisella ionisaatiolla)	Huomautuksia
275.99976	273.98593	DM-happo		1.31/1.32	
274.02057	-	Metyloitunut DM-happo		1.44/-	
135.04	-	2-fenyyli- etikkahappo		-	Ei havaittavissa LC-MS:llä

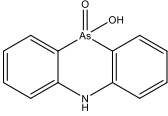
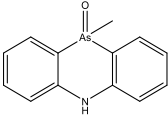
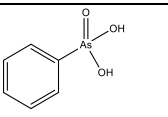
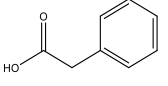
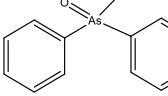
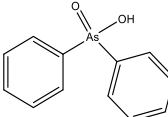
Taulukko 21: Sedimenttinäytteen R2953 fraktion 10 Orbitrap -ajoissa havaitut aromaattiset arseeniyhdisteet sekä 2-fenyylietikkahappo, havaitut massat positiivisella ja negatiivisella ionisoinnin tuottamalla polarisuudella mitattuina

<i>m/z</i> (polarisuus: positiivinen)	<i>m/z</i> (polarisuus: negatiivinen)	Etsitty yhdiste	Etsityn yhdisteen ionisoitumaton rakenne	RT (min) (positiivisella ionisaatiolla / negatiivisella ionisaatiolla)	Huomautuksia
274.02057	-	Metyloitunut DM-happo		1.44/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla
261.02533	-	Metyloitunut difenyyliarsi inihappo		1.85/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla
275.99976	273.98593	DM-happo		1.32/1.32	
-	135.04488	2-fenyyli- etikkahappo		-/2.01	Ei havaittavissa positiivisella ionisaatiolla
325.24829	-	TPAO		2.79/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla
263.00467	-	DPAA		2.01/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla

Taulukko 22: Sedimenttinäytteen R2953 fraktion 5 Orbitrap -ajoissa havaitut aromaattiset arseeniyhdisteet sekä 2-fenyylietikkahappo, havaitut massat positiivisella ja negatiivisella ionisoinnin tuottamalla polaarisuudella mitattuina

<i>m/z</i> (polaarisuus: positiivinen)	<i>m/z</i> (polaarisuus: negatiivinen)	Etsitty yhdiste	Etsityn yhdisteen ionisoitumaton rakenne	RT (min) (positiivisella ionisaatiolla / negatiivisella ionisaatiolla)	Huomautuksia
275.99979	273.98593	DM-happo		1.32/1.33	
202.96834	200.95393	MPAA		0.80/0.80	
274.02076	-	Metyloitunut DM-happo		1.44/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla
-	135.04486	2-fenyylie- tikkahappo		1.81?	
261.02533	-	Metyloitunut DPAA		1.85/-	Signaalin intensiteetti pieni
263.00461	-	DPAA		2.00/2.00	Negatiivipuolella intensiteetti on pieni, eikä kirjasto- ohjelmisto tarjoa etsittyä rakennetta









Taulukko 23: Sedimenttinäytteen R2953 fraktion 5 Orbitrap -ajoissa havaitut aromaattiset arseeniyhdisteet sekä 2-fenyylietikkahappo, havaitut massat positiivisella ja negatiivisella ionisoinnin tuottamalla polaarisuudella mitattuina

<i>m/z</i> (polaarisuus: positiivinen)	<i>m/z</i> (polaarisuus: negatiivinen)	Etsitty yhdiste	Etsityn yhdisteen ionisoitumaton rakenne	RT (min) (positiivisella ionisaatiolla / negatiivisella ionisaatiolla)	Huomautuksia
275.99976	273.98593	DM-happo		1.32/1.32	
274.02057	-	Metyloitunut DM-happo		1.44/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla
202.96817		MPAA		0.80/0.80	
135.04489		2-fenyylie- tikkahappo		-/1.83	
261.02533	-	Metyloitunut DPAA		1.85/-	Signaalin intensiteetti on heikko
263.00458		DPAA		1.99/-	Ei havaittavissa negatiivisella ionisaatiolla

Orbitrap-ajojen tulokset tukivat aikaisempia NMR:llä tehtyjä havaintoja monofenyyliaarsiinihapon sekä Adamsiitin arsiinihapon ja tämän metyloituneen muodon löytymisestä tietyistä fraktioista, mutta näiden lisäksi pienempiä pitoisuuksia muita seulottuja arseeniyhdisteitä voitiin luotettavasti havaita eri fraktioissa. Tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa kunkin näytteen osalta sekä koottu värikoodattuihin

yhteenvetotaulukoihin (Taulukko 24 ja Taulukko 25), joissa vihreä väri viittaa siihen, että rakenne on havaittu NMR:ssä ja/tai muilla menetelmillä, jotka on nimetty solussa. Keltainen väri viittaa siihen, että rakenne voi mahdollisesti olla oikea tai havaittu fraktiossa, mutta olemassa olevalla datalla varmoja johtopäätöksiä ei pystytä tekemään. Joissain tapauksissa epävarmuutta on korostettu kysymysmerkillä. Jos taulukon solu on värikoodattu jonkin fraktion osalta, mutta solu sisältää rakenteen, viittaa väri kyseiseen rakenteeseen, eikä rivin yleiseen rakenteeseen, paitsi, jos rivin rakenteen löytötavat on merkattu erikseen ennen ylimääräistä rakennetta. Havaitut rakenteet, jotka ovat varmistuneet kahdella tai useammalla menetelmällä tai luotettavasti Orbitrapilla oikean fragmentoitumisen perusteella on lihavoitu

Taulukko 24: Sedimentistä 2953 NMR:llä ja LC-MS:llä (Orbitrap ja LXQ) löydetty aromaattiset arseeniyhdisteet ja aromaattiset osarakenteet

Rakenne tai osarakenne /fraktio	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	NMR	NMR	NMR	NMR	NMR?	NMR	NMR	NMR (NOE-differenssikoe)		NMR
								NMR	NMR	
								NMR	NMR	
	NMR?	NMR	NMR?	NMR	NMR	NMR	NMR	NMR (NOE-differenssikoe)	NMR	NMR
						NMR				
				NMR LXQ? (m/z=274)		LXQ? (m/z=24)		NMR LXQ? (m/z=290)	LXQ? (m/z=290) NMR?	
				LXQ NMR Orbitrap	LXQ Ei havaita NMR:llä	NMR		NMR (NOE-differenssikoe)	Orbitrap	
				LXQ Orbitrap	LXQ Ei havaita NMR:llä			NMR LXQ	Orbitrap	
Mono-substituituita bentseeniä									Orbitrap:	

*Havaittavissa vain pidemmissä NOE-differenssikokeissa

Taulukko 25: Sedimentistä 3023 NMR:llä ja LC-MS:llä (Orbitrap ja LXQ) löydetyt aromaattiset arseeniyhdisteet ja aromaattiset osarakenteet

Rakenne tai osarakenne / fraktio	4	5	6	7	8	9	10
	NMR	NMR	NMR	NMR	NMR		NMR
						NMR	NMR
						NMR	NMR
	NMR						
	NMR	NMR	NMR	NMR	NMR		NMR
					NMR		
Muita monosubstituituitua bentseenejä	<p>NMR+Orbitrap:</p> <p>Orbitrap:</p> <p>LXQ+Orbitrap:</p>	<p>NMR+Orbitrap:</p> <p>LXQ+Orbitrap:</p> <p>Orbitrap:</p>	<p>LXQ?</p> <p>(m/z=261)</p>	LXQ?			
	<p>NMR, LXQ, Orbitrap</p> <p>+Orbitrap:</p>	<p>Orbitrap</p> <p>+LXQ+Orbitrap:</p>					

14. Yhteenveto

Tutkielman käytännön osiossa todettiin protonoitumaan kykenevien aromaattisten arseeniyhdisteiden aromaattisten protonien kemiallisten siirtymien muuttuvan odotetusti pH:n funktiona mukautettua Henderson-Hasselbalch -käyrää seuraten. Adamsiitin arsiinihapolle, johon suuri osa tutkimuksesta keskittyi, todettiin myös J-kytkentöjen seuraavan samaa trendiä. Arseeniyhdisteelle, jolla ei taipumusta protonoitumiseen ollut (TPA), todettiin protonien siirtymien pysyvän samoina pH:sta riippumatta. Lisäksi pH-riippuvuuden todettiin pitävän paikkansa myös ”tavallisemmalle” hapolle, joka ei sisältänyt arseenia, sillä 2-fenyylietikkahapon protonien siirtymien muutos seurasi tarkasti edellä mainittua käyrää.

Siirtymien pH-riippuvuuksien tulokset olivat tarpeeksi tarkkoja ja johdonmukaisia, jotta niiden pohjalta kyettiin seulomaan sedimenttinäytteitä ja identifioimaan ja todentamaan NMR:n perusteella kahden tutkitun yhdisteen läsnäolo näytteiden yksittäisissä fraktioissa (DM-happo ja MPAA). Erilaisten LC-MS-menetelmien avulla myös muita tutkittuja yhdisteitä löydettiin näytteistä, joskin suuri osa havaituista aromaattisista yhdisteistä jäi tunnistamatta osarakenteita lukuun ottamatta. Muita analyysimenetelmiä hyödynnettiin myös metyloituneen DM-hapon läsnäolon varmentamisessa, mutta lopullinen todistus yhdisteen rakenteesta saatiin aikaan NMR:llä suoritetuilla NOE-differenssikokeilla.

Protonien siirtymien riippuvuuksien tutkiminen osoittautui tehokkaaksi tavaksi tunnistaa kohdeyhdisteitä ympäristönäytteistä, vaikka varsinaisen näytteen pH:ta ei ennalta tunnuttakaan. Riippuvuussarjoihin perustuvan datan avulla oli mahdollista paitsi todistaa etsittyjen yhdisteiden

löytyminen sedimenteistä, myös laskea näytteen tarkka pH. Tätä tietoa voitaisiin mahdollisesti käyttää hyväksi myös toistaiseksi tunnistamatta jääneiden aromaattisten yhdisteiden tunnistuksessa. Riippuvuuden hyödyllisyyden vuoksi olisi oletettavaa, että siirtymien riippuvuuksien tutkiminen muidenkin parametrien, kuten konsentraation ja lämpötilan, yhteydessä olisi suotavaa yhdisteille, joiden hyödyntämisestä tutkimuksessa oltaisiin kiinnostuneita.

Kaiken kaikkiaan voidaan sanoa, että osa tavoitteista saavutettiin, sillä arseeniyhdisteiden pH-riippuvuutta saatiin tutkittua onnistuneesti samalla tuottaen tutkimuksen avuksi kelpaavaa dataa, sedimenttinäytteistä löydettiin etsittyjä yhdisteitä ja muita aikaisemmin tuntemattomia rakenteita. Selviksi kehitysmahdollisuuksiksi työssä nousevat tuntemattomien yhdisteiden laajempialainen tunnistus, joka valitettavasti jäi vaillinaiseksi näytteiden pienten pitoisuuksien vuoksi. Myös Adamsiitin arsiinihapon puhdasaineen metanoliliuoksen sivureaktioiden tuotteen tunnistus olisi ollut toivottavaa, mutta se ei ainakaan käytössä olleilla menetelmillä ollut mahdollista. Toisaalta reaktiotuotteen syntymisen havaitseminen tarjoaa arvokasta tietoa tulevaisuuden varalta DM-hapon käyttöön ja säilytykseen liittyen.

16. Viitteet

- 1 H. Friebolin, *Basic one- and two-dimensional NMR spectroscopy*, Wiley-VCH, Weinheim, 3rd rev. e., 1998.
- 2 R. E. Hoffman ja E. D. Becker, *J. Magn. Reson.*, 2005, **176**, 87–98.
- 3 R. E. Hoffman, *J. Magn. Reson.*, 2003, **163**, 325–331.
- 4 R. E. Hoffman, *Magn. Reson. Chem.*, 2006, **44**, 606–616.
- 5 H. J. Bernstein, J. A. Pople ja W. G. Schneider, *Can. J. Chem.*, 1957, **35**, 67–83.
- 6 T. N. Vu ja K. Laukens, *Metabolites*, 2013, **3**, 259–276.
- 7 A. Gryff-Keller ja P. Szczeciński, *J. Mol. Struct.*, 2010, **967**, 94–98.
- 8 S. Suzuki, F. Horii ja H. Kurosu, *J. Mol. Struct.*, 2009, **921**, 219–226.
- 9 S. Suzuki, F. Horii ja H. Kurosu, *J. Mol. Struct.*, 2009, **919**, 290–294.
- 10 D. K. Dalling ja D. M. Grant, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 5318–5324.
- 11 J. G. Batchelor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1976, 1585–1590.
- 12 M. W. Lodewyk, M. R. Siebert ja D. J. Tantillo, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 1839–1862.
- 13 M. D. Sindkhedkar, H. R. Mulla ja A. Cammers-Goodwin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9271–9277.
- 14 Z. Atieh, M. Aubert-Frécon ja A. Allouche, *J. Phys. Chem. B*, 2010, **114**, 16388–16392.
- 15 R. Jain, T. Bally ja P. R. Rablen, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 4017–4023.
- 16 R. M. M. Claramunt, C. López, M. Á. García, G. S. Denisov, I. Alkorta ja J. Elguero, *New J. Chem.*, 2003, **27**, 734–742.
- 17 R. Laatikainen, T. Hassinen, J. Lehtivarjo, M. Tiainen, J. Jungman, T. Tynkkynen, S. P. Korhonen, M. Niemitz, P. Poutiainen, O. Jääskeläinen, T. Väisänen, J. Weisell, P. Soininen, P. Laatikainen, H. Martonen ja K. Tuppurainen, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, **54**, 419–430.
- 18 S. Amirthaganesan, R. T. Sabapathy Mohan, K. Murugavel, G. Muthukumaran, K. Pandiarajan, S. R. T. Mohan, K. Murugavel, G.

- Muthukumaran ja K. Pandiarajan, *Indian J. Chem.*, 2007, **46B**, 1004–1013.
- 19 K. Schaper, *Magn. Reson. Chem.*, 2008, **46**, 1163–1167.
 - 20 Y. Yanuka, S. Y. Superstine ja E. Superstine, *J. Pharm. Sci.*, 1979, **68**, 1400–1403.
 - 21 R. M. Claramunt, C. López, M. D. Santa María, D. Sanz ja J. Elguero, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2006, **49**, 169–206.
 - 22 R. J. Abraham, M. Edgar, R. P. Glover, M. A. Warne ja L. Griffiths, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 333–341.
 - 23 R. G. E. Morale ja M. A. Leiva, *Spectrosc. Lett.*, 1997, **30**, 557–565.
 - 24 F. F. Yew, R. J. Kurland ja B. J. Mair, *Anal. Chem.*, 1964, **36**, 843–845.
 - 25 A. Kwiatkowski, I. Grela ja B. Ośmiałowski, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 1073–1081.
 - 26 G. Brink, C. Campbell ja L. Glasser, *J. Phys. Chem.*, 1976, **80**, 2560–2563.
 - 27 D. M. Cheng, L. S. Kan, P. O. P. Ts'o, C. Giessner-Prettre ja B. Pullman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 525–534.
 - 28 J. L. Dimicoli ja C. Hélène, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 1036–1044.
 - 29 J. B. Chaires, N. Dattagupta ja D. M. Crothers, *Biochemistry*, 1982, **21**, 3927–3932.
 - 30 R. J. Abraham, M. A. Warne ja L. Griffiths, *Magn. Reson. Chem.*, 1998, **36**, 179–188.
 - 31 S. R. Laplante, R. Carson, J. Gillard, N. Aubry, R. Coulombe, S. Bordeleau, P. Bonneau, M. Little, J. O'Meara ja P. L. Beaulieu, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 5142–5150.
 - 32 S. H. Gellman, G. P. Dado, G. B. Liang ja B. R. Adams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1164–1173.
 - 33 M. Pérez, T. M. Peakman, A. Alex, P. D. Higginson, J. C. Mitchell, M. J. Snowden ja I. Morao, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 3103–3110.
 - 34 A. D. Buckingham, T. Schaefer ja W. G. Scheiner, *J. Chem. Phys.*, 1960, **32**, 1227–1233.
 - 35 Y.-P. Pang, J. L. Miller ja P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1717–1725.

- 36 G. A. Breault, C. A. Hunter ja P. C. Mayers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 3402–3410.
- 37 G. Vlahov, A. A. Giuliani ja P. Del Re, *Anal. Methods*, 2010, **2**, 916–923.
- 38 C. Bonechi, S. Martini, A. Magnani ja C. Rossi, *Magn. Reson. Chem.*, 2008, **46**, 625–629.
- 39 S. Lahiri, J. L. Thompson ja J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 11315–11319.
- 40 L. F. Newcomb ja S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4993–4994.
- 41 K. Kondo, M. Miyata ja T. Kiichi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1971, **44**, 2554–2555.
- 42 S. H. Gellman, T. S. Haque ja L. F. Newcomb, *Biophys. J.*, 1996, **71**, 3523–3526.
- 43 N. S. Nudelman ja C. E. S. Alvaro, *J. Phys. Org. Chem.*, 2011, **24**, 1067–1071.
- 44 T. Tsukahara, M. Harada, H. Tomiyasu ja Y. Ikeda, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 9657–9664.
- 45 J. G. Morton, C. L. Joe, M. C. Stolla, S. R. Koshland, C. H. Londergan ja M. H. Schofield, *J. Chem. Educ.*, 2015, **92**, 1086–1090.
- 46 P. L. Corio ja B. P. Dailey, *J. Chem. Phys.*, 1956, **25**, 1291–1292.
- 47 M. Jörg, S. Headey, P. J. Scammells ja B. Capuano, *Magn. Reson. Chem.*, 2014, **52**, 715–718.
- 48 I. Canals, J. A. Portal, E. Bosch ja M. Rosés, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1802–1809.
- 49 A. A. Bothner-By ja R. E. Glick, *J. Chem. Phys.*, 1957, **26**, 1647.
- 50 W. Drinkard ja D. Kivelson, *J. Mol. Spectrosc.*, 1958, **62**, 1494–1498.
- 51 D. H. Barich, J. B. Nicholas, X. Teng ja J. F. Haw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 12342–12350.
- 52 A. Lopalco, J. Douglas, N. Denora ja V. J. Stella, *J. Pharm. Sci.*, 2016, **105**, 664–672.
- 53 M. Poe, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 7025–7032.
- 54 I. Katsuyama, A. A. Khalil, C. Dunbar ja J. K. Zjawiony, *Spectrosc. Lett.*, 2003, **36**, 477–485.

- 55 A. Mitra, P. J. Seaton, R. A. Assapour ja T. Williamson, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 15489–15498.
- 56 R. J. Abraham ja M. Mobli, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, **45**, 865–877.
- 57 A. Beneduci, G. Chidichimo, G. Dardo ja G. Pontoni, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **685**, 186–195.
- 58 P.-M. L. Robitaille, P. A. Robitaille, G. G. Brown Jr. ja G. G. Brown, *J. Magn. Reson.*, 1991, **92**, 73–84.
- 59 G. Platzer, M. Okon ja L. P. McIntosh, *J. Biomol. NMR*, 2014, **60**, 109–129.
- 60 Z. Szakács ja G. Hägele, *Talanta*, 2004, **62**, 819–825.
- 61 T. R. Eykyn ja P. W. Kuchel, *Magn. Reson. Med.*, 2003, **50**, 693–696.
- 62 Z. Szakács, G. Hägele ja R. Tyka, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **522**, 247–258.
- 63 E. I. Hyde, V. Ramesh, G. C. Roberts, C. H. Arrowsmith, L. Treat-Clemons, B. Klaic ja O. Jardetzky, *Eur. J. Biochem.*, 1989, **183**, 545–553.
- 64 G. D. Tredwell, J. G. Bundy, M. De Iorio ja T. M. D. Ebbels, *Metabolomics*, 2016, **12**, 1–10.
- 65 M. Lauridsen, S. H. Hansen, J. W. Jaroszewski ja C. Cornett, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 1181–1186.
- 66 T. Tynkkynen, M. Tiainen, P. Soininen ja R. Laatikainen, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **648**, 105–112.
- 67 L. Jiang, J. Huang, Y. Wang ja H. Tang, *Analyst*, 2012, **137**, 4209.
- 68 M. DeFronzo ja R. J. Gilliess, *J. Biol. Chem.*, 1987, **262**, 11032–11037.
- 69 M. Briceño, M. Escudey, G. Galindo, D. Borchardt ja A. C. Chang, *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 2006, **37**, 1553–1569.
- 70 V. M. Asiago, G. A. Nagana Gowda, S. Zhang, N. Shanaiah, J. Clark ja D. Raftery, *Metabolomics*, 2008, **4**, 328–336.
- 71 M. Huelsekopf ja R. Ludwig, *J. Mol. Liq.*, 2000, **85**, 105–125.
- 72 T. C. Stringfellow ja T. C. Farrar, *Spectrochim. Acta A*, 1997, **53**, 2425–2433.
- 73 R. Laatikainen, J. Ratilainen, R. Sebastian ja H. Santa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 11006–11010.

- 74 R. C. Schweitzer ja G. W. Small, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1996, **36**, 310–322.
- 75 F. V. Toukach ja V. P. Ananikov, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 8376–8415.
- 76 M. Elyashberg, *Trends Anal. Chem.*, 2015, **69**, 88–97.
- 77 O. Ivanciuc, J.-P. Rabine, D. P. Cabrol-Bass, A. Panaye ja J.-P. Doucet, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1997, **37**, 587–598.
- 78 R. R. Kapaev ja P. V. Toukach, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 7006–7010.
- 79 H. Zhang, S. Neal ja D. S. Wishart, *J. Biomol. NMR*, 2003, **25**, 173–195.
- 80 A. Bagno, F. Rastrelli ja G. Saielli, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 7373–7381.
- 81 H. J. Koch ja A. S. Perlin, *Carbohydr. Res.*, 1970, **15**, 403–410.
- 82 A. Kosaka, M. Aida ja Y. Katsumoto, *J. Mol. Struct.*, 2015, **1093**, 195–200.
- 83 M. E. Munk, *J. Chem. Inf. Model.*, 1998, **38**, 997–1009.
- 84 D. J. Marell, S. J. Emond, A. Kulshrestha ja T. R. Hoye, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 752–758.
- 85 Y. Jing, H. Shen-Xiong ja Z. Qin-Shi, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 12132–12139.
- 86 C. W. Crandell, N. A. B. Gray ja D. H. Smith, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1982, **22**, 48–57.
- 87 M. U. Roslund, P. Tähtinen, M. Niemitz ja R. Sjöholm, *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 101–112.
- 88 J. Meiler ja M. Will, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2001, **41**, 1535–1546.
- 89 N. J. Heaton, P. Bello, B. Herradón, A. Del Campo ja J. Jiménez-Barbero, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 12371–12384.
- 90 M. N. A. Mohamed, H. D. Watts, J. Guo, J. M. Catchmark ja J. D. Kubicki, *Carbohydr. Res.*, 2010, **345**, 1741–1751.
- 91 M. Rezaei-Sameti, *Chin. J. Chem.*, 2011, **29**, 237–242.
- 92 J. J. Eriksen, J. M. H. Olsen, K. Aidas, H. Ågren, K. V. Mikkelsen ja J. Kongsted, *J. Comput. Chem.*, 2011, **32**, 2853–2864.
- 93 A. Bagno, *Chem. - A Eur. J.*, 2001, **7**, 1652–1661.

- 94 R. R. Kapaev, K. S. Egorova ja P. V. Toukach, *J. Chem. Inf. Model.*, 2014, **54**, 2594–2611.
- 95 R. C. Schweitzer ja G. W. Small, *J. Chem. Inf. Model.*, 1996, **36**, 46–53.
- 96 D. E. Williams, M. B. Peters, B. Wang, A. E. Roitberg ja K. M. Merz, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 11550–11559.
- 97 T. H. Sefzik, J. M. Fidler, R. J. Iuliucci ja J. C. Facelli, *Magn. Reson. Chem.*, 2006, **44**, 390–400.
- 98 P. Cimino, L. Gomez-Paloma, D. Duca, R. Riccio ja G. Bifulco, *Magn. Reson. Chem.*, 2004, **42**, S26–S33.
- 99 E. Toomsalu ja P. Burk, *J. Mol. Model.*, 2015, **21**, 244.
- 100 L. C. Pop, D. M.-L. Carey, A. Muñoz-Castro, L. Silaghi-Dumitrescu, A. Castel ja R. Arratia-Pérez, *Polyhedron*, 2011, **30**, 841–845.
- 101 L. Chen ja W. Robien, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1993, **19**, 217–223.
- 102 J. C. Facelli, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2011, **58**, 176–201.
- 103 Y. D. Smurnyy, K. A. Blinov, T. S. Churanova, M. E. Elyashberg ja A. J. Williams, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 128–134.
- 104 C. Lingran ja W. Robien, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 2282–2287.
- 105 N. Goudarzi, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2016, **158**, 60–64.
- 106 D. A. Forsyth ja A. B. Sebag, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 9483–9494.
- 107 O. Ivanciuc, J.-P. Rabine, D. Cabrol-Bass, a. Panaye ja J. P. Doucet, *J. Chem. Inf. Model.*, 1996, **36**, 644–653.
- 108 G. Kateman, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1993, **19**, 135–142.
- 109 L. Terfloth ja J. Gasteiger, *DDT*, 2001, **6**, S102–S108.
- 110 J. Meiler, R. Meusinger ja M. Will, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2000, **40**, 1169–1176.
- 111 J. O. Aires-De-Sousa, M. C. Hemmer ja J. Gasteiger, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 80–90.
- 112 A. Yan ja J. Gasteiger, teoksessa *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 2003, ss. 429–434.
- 113 D. A. Veselkov, V. A. Sigaev, S. A. Vysotskii, L. N. Dymant, D.

- B. Davies ja A. N. Veselkov, *J. Struct. Chem.*, 2000, **41**, 72–80.
- 114 J. Kongsted, K. Aidas, K. V. Mikkelsen ja S. P. A. Sauer, *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, **4**, 267–277.
- 115 M. Elyashberg, K. Blinov, Y. Smurnyy, T. Churanova ja A. Williams, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, **48**, 219–229.
- 116 C. J. Jameson, *ACS Symp. Ser.*, 1999, **732**, 1–23.
- 117 K. Wolinski, J. F. Hinton ja P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8251–8260.
- 118 Y. Zhao ja D. G. Truhlar, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 157–167.
- 119 G. Schreckenbach ja T. Ziegler, *Theor. Chem. Accounts Theory, Comput. Model. (Theoretica Chim. Acta)*, 1998, **99**, 71–82.
- 120 Z. B. Maksic, K. Kovacevic ja M. Primorac, *Pure Appl. Chem.*, 1989, **61**, 2075–2085.
- 121 G. Fogarasi ja P. G. Szalay, *J. Phys. Chem. A*, 1997, **101**, 1400–1408.
- 122 P. Pyykkö, *Theor. Chem. Accounts Theory, Comput. Model. (Theoretica Chim. Acta)*, 2000, **103**, 214–216.
- 123 M. ZhiZhong ja W. R. Carper, *J. Mol. Struct.*, 2002, **588**, 45–53.
- 124 A. Simperler, R. Bell ja M. Anderson, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 7142–7151.
- 125 K. W. Wiitala, C. J. Cramer ja T. R. Hoye, *Magn. Reson. Chem.*, 2007, **45**, 819–829.
- 126 M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy ja J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 3902–3909.
- 127 I. Yavari, D. Tahmassebi, A. Zonouzi ja D. Nori-shargh, *J. Chem. Res.*, 1997, 476–477.

17. Liitteet

Liite 1: Adamsiitin arsiinihapon (yhdiste 1) ja sen reaktiotuotteen (yhdiste 2) pH-sarjan näytteiden PERCH -iterointien tulokset

	pH	0,3	1,44	4,86	6,24	6,4	6,06	6,17	6,42	8,25	12,57
Siirtymät	Hc1	7,827644	7,752781	7,617134	7,611146	7,609965	7,608732	7,60224	7,596426	7,435934	7,416677
	Hb1	7,357242	7,301429	7,189728	7,185419	7,184576	7,183638	7,178581	7,174063	7,049857	7,034078
	Hd1	7,492353	7,40189	7,279427	7,268432	7,267642	7,266595	7,260358	7,254865	7,105012	7,087389
	Ha1	7,947167	7,921609	7,864543	7,864516	7,864643	7,86466	7,864678	7,864559	7,8646	7,863484
	Hc2	7,831167	7,700476	7,680053				7,679034		7,678416	
	Hb2	7,366326	7,25321	7,236515				7,236032		7,23556	
	Hd2	7,486266	7,359582	7,345145				7,338492		7,338235	
	Ha2	7,956858	7,863666	7,849874				7,850336		7,849891	
J-kytkennät	Hc1,Hb1	7,1779	7,1787	7,1861	7,1784	7,1847	7,1831	7,1804	7,1845	7,176	7,1704
	Hc1,Hd1	8,6146	8,5651	8,483	8,4882	8,4879	8,4834	8,4665	8,4824	8,3975	8,3929
	Hc1,Ha1	1,5167	1,5042	1,5598	1,5504	1,5547	1,5601	1,5477	1,5558	1,5774	1,5793
	Hb1,Hd1	0,9683	0,9561	0,9812	0,985	0,9745	0,9771	0,9812	0,98	0,997	1,0005
	Hb1,Ha1	7,9793	7,9104	7,7923	7,8014	7,7997	7,7983	7,7713	7,7869	7,6682	7,671
	Hd1,Ha1	0,5137	0,5098	0,495	0,4914	0,4862	0,4856	0,4926	0,4917	0,4901	0,4872
	Hc2,Hb2	7,1824	7,1847	7,1618				7,1683		7,1653	
	Hc2,Hd2	8,6082	8,5256	8,5242				8,5171		8,5189	
	Hc2,Ha2	1,5184	1,5678	1,5275				1,5416		1,5199	
	Hb2,Hd2	0,962	0,9761	0,9748				0,9887		0,9838	
	Hb2,Ha2	7,9632	7,8456	7,8592				7,8496		7,8431	
	Hd2,Ha2	0,4981	0,4941	0,5228				0,5139		0,5324	

Liite 2: Trifenyyliarseenioksidin (TPAO) PERCH -iterointien tulokset (harmaalla) pohjalla

	pH	0,58	2,66	4,6	6,1	6,31	7	7,37	9,19	9,46	12,75
Siirtymät	Hc	7,802799	7,732015	7,641357	7,64128	7,641045	7,641584	7,640808	7,640889	7,641244	7,640967
	Hb	7,873768	7,807566	7,723555	7,723237	7,723306	7,723745	7,72298	7,723289	7,723363	7,72342
	Hd	7,911252	7,824455	7,711932	7,711876	7,711635	7,712228	7,711429	7,711474	7,711811	7,711603
J-kytkennät	Hc, Hc	1,2986	1,2918	1,3215	1,3	1,3013	1,1406	1,3122	1,3075	1,3023	1,2898
	Hc, Hb	7,8498	7,802	7,7301	7,7303	7,7235	7,7322	7,7281	7,7292	7,7272	7,7198
	Hb, Hc	0,5881	0,5919	0,6097	0,6093	0,6105	0,5653	0,6002	0,6064	0,6136	0,6119
	Hc, Hd	7,6092	7,5961	7,5624	7,5685	7,5752	7,5858	7,5795	7,5717	7,5685	7,5698
	Hb, Hb	1,7598	1,7114	1,6634	1,6549	1,6493	1,694	1,6594	1,6473	1,6478	1,6367
	Hb, Hd	1,1852	1,1945	1,2212	1,2267	1,2328	1,1559	1,2248	1,2365	1,2333	1,2248

esitetyt kytkennät jätetty Matlab-sovituksesta pois oletetun pH-mittausvirheen vuoksi)

Liite 3: Fenyyliklooriarseenin (PDCA) PERCH -iterointien tulokset

	pH	1,96	1,57	1,42	1,31	1,44	1,55	2,21	0,51	12,18
siirtymät	Hc	7,483671	7,476495	7,483101	7,483431	7,482241	7,476268	7,470359	7,492315	7,470804
	Hd	7,47772	7,469497	7,47702	7,477374	7,476033	7,469233	7,462291	7,487233	7,463622
	Hb	7,694728	7,666577	7,692298	7,693585	7,68901	7,665844	7,642463	7,728042	7,637905
J-kytkennät	Hc, Hc	1,328	1,2402	1,3043	1,2966	1,2976	1,2517	1,2862	1,3358	1,3025
	Hc, Hd	7,4542	7,4879	7,4857	7,4674	7,4844	7,4759	7,4706	7,5127	7,334
	Hc, Hb	7,6914	7,6115	7,6371	7,6327	7,6386	7,6033	7,5014	7,5808	7,512
	Hb, Hc	0,6602	0,6794	0,6762	0,6713	0,6708	0,6748	0,6527	0,6182	0,5551
	Hd, Hb	1,183	1,2188	1,2087	1,2232	1,2075	1,236	1,3645	1,3375	1,3635
	Hb, Hb	1,5142	1,5072	1,4904	1,4635	1,4767	1,4528	1,518	1,56	1,5156

Liite 4: Monofenyylarsiinihapon (MPAA) ja sen reaktiotuotteen PERCH -iterointien tulokset (harmaalla pohjalla esitetyt arvot lukittu iteroinnissa)

	pH	0,22	1,96	3,99	4,07	4,1	4,24	4,24	4,87	5,97	12,69
siirtymät	Hc1	7,696536	7,674997	7,671966	7,662309	7,663071	7,661558	7,659487	7,649453	7,571866	7,536514
	Hd1	7,774644	7,767344	7,763412	7,750856	7,751801	7,749822	7,7471	7,734118	7,633159	7,587332
	Hb1	7,856355	7,852305	7,851596	7,850933	7,851	7,850776	7,850603	7,849943	7,843589	7,840312
	Hc2	7,678478	7,65672	7,647145	7,645551	7,645634	7,645351	7,644581	7,64279	7,603049	
	Hd2	7,716267	7,711221	7,711409	7,711045	7,710977	7,710911	7,711247	7,696154	7,697299	
	Hb2	7,903608	7,873493	7,868451	7,868314	7,8685	7,868377	7,868425	7,868651	7,8714	
J- kytkennät	Hc1, Hc1	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991	1,2991
	Hc1,Hd1	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291	7,5291
	Hc1,Hb1	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557	7,6557
	Hb1,Hc1	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295	0,6295
	Hd1,Hb1	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927	1,2927
	Hb1,Hb1	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238	1,5238
	Hc2,Hc2	1,4907	0,0005	0,0015	0,0166	0,1433	0,0088	0,0005	0,021	0,0158	
	Hc2,Hd2	7,9037	7,6919	7,5837	7,175	7,1813	7,1547	7,2641	7,71	7,5315	
	Hc2,Hb2	7,1456	7,8924	7,7862	8,0465	7,8203	8,0542	7,9573	7,8285	7,7273	
	Hb2,Hc2	0,6183	0,6937	0,1879	0,0345	0,105	0,1364	0,4749	0,4472	0,627	
	Hd2,Hb2	0,221	0,2504	0,3364	0,0093	0,0409	0,0269	0,3066	0,8269	1,2802	
	Hb2,Hb2	0,0018	0,0865	0,4732	0,0654	0,0001	0,2061	0,0259	0,2983	0,2567	

Matlab-sovitusten tiedot ja niihin perustuvat arvot:

Liite 5: Diproottinen sovitus:

$$f(x)=a/(1+10^{(x-d)}+10^{(2*x-d-e)})+b/(1+10^{(d-x)}+10^{(x-e)})+c/(1+10^{(e-x)}+10^{(d+e-2*x)})$$

a=H₂A siirtymä/kytkentä

b=HA siirtymä/kytkentä

c=A⁻ siirtymä/kytkentä

d=pK_{a1}

e=pK_{a2}

x=pH

Liite 6: Monoproottinen sovitus:

$$f(x) = (a+(b*10^{(x-c)}))/(10^{(x-c)}+1)$$

a=HA siirtymä/kytkentä

b=A⁻ siirtymä/kytkentä

c=pK_a

x=pH

Liite 7: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) siirtymien Matlab-sovituksista saadut siirtymät sekä pK_{a1}- ja pK_{a2}-arvot (c.b.=confidence bounds). Tummanharmaalla pohjalla esitetyt arvot eroavat muista laskennallisista arvoista ja ovat epäluotettavia:

	Ha	Ha c.b.	Hb	Hb c.b.	Hc	Hc c.b.	Hd	Hd c.b.
a	7,95	7.95, 7.95	7,364	7.35, 7.378	7,837	7.819, 7.856	7,505	7.488, 7.523
b	7,865	7.864, 7.865	7,192	7.184, 7.2	7,62	7.609, 7.63	7,279	7.268, 7.29
c	7,863	7.863, 7.864	7,032	7.021, 7.043	7,414	7.4, 7.428	7,086	7.073, 7.098
d	1,74	1.733, 1.748	1,683	1.506, 1.86	1,638	1.46, 1.816	1,515	1.364, 1.666
e	9,282	7.947, 10.62	7,41	7.096, 7.725	7,394	7.075, 7.714	7,34	7.028, 7.652

Liite 8: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) J-kytkentöjen Matlab-sovituksista saadut J-kytkennät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds):

	HbHd	HbHd c.b.	HcHb	HcHb c.b.	HcHd	HcHd c.	HbHa	HbHa c.b.	HcHa	HcHa c.b.	HdHa	HdHa c.b.
a	0,9623	0.9521, 0.9724	7,185	7.172, 7.198	8,621	8.592, 8.651	7,988	7.945, 8.032	1,51	1.494, 1.526	0,5141	0.5048, 0.5234
b	0,9794	0.9711, 0.9876	7,176	6.922, 7.43	8,487	8.471, 8.502	7,8	7.774, 7.826	1,554	1.543, 1.565	0,4977	0.4368, 0.5586
c	1,001	0.9869, 1.015	7,17	-1.316, 15.66	8,389	8.367, 8.412	7,663	7.631, 7.695	1,581	1.563, 1.598	0,4888	0.4835, 0.4942
d	3,586	-5.273, 12.45	6,661	-12.19, 25.52	1,584	1.149, 2.	1,591	1.127, 2.055	3,151	-5.814, 12.12	1,894	-0.8269, 4.616
e	7,693	5.485, 9.901	11,19	-1.561 e+004, 1.564 e+004	7,449	6.421, 8.477	7,366	6.259, 8.473	7,622	5.153, 10.09	5,083	-2.746, 12.91

Liite 9: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) siirtymien reaktiotuotteen Matlab-sovituksista saadut siirtymät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds):

	HbHd	HcHb	HcHd	HbHa	HcHa	HdHa
a	0,9346	7,184	8,78	8,22	1,415	0,5033
b	0,9764	7,02	8,521	7,832	1,572	0,4946
c	0,9869	7,167	8,518	7,851	1,529	0,5247
d	0,0001977	4,822	0,001693	0,004565	0,001868	0,00007791
e	5,826	3,456	5,342	3,055	3,466	4,178

Liite 10: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) reaktiotuotteen J-kytkentöjen diproottisista Matlab-sovituksista saadut J-kytkennät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds):

	Ha	Hb	Hc	Hd
a	8,07	7,501	7,983	7,762
b	7,85	7,236	7,68	7,346
c	7,85	7,236	7,678	7,338
d	0,2749	0,2846	0,2958	0,002324
e	3,816	6,45	5,899	5,407

Liite 11: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) reaktiotuotteen J-kytkentöjen monoproottisista Matlab-sovituksista saadut J-kytkennät sekä pK_a -arvot (c.b.=confidence bounds):

	Ha	Ha c.b.	Hb	Hb c.b.	Hc	Hc c.b.	Hd	Hd c.b.
a	8,079	8.051, 8.107	7,504	7.46, 7.548	7,971	7.912, 8.03	7,645	7.262, 8.028
b	7,85	7.849, 7.851	7,236	7.235, 7.237	7,679	7.677, 7.681	7,341	7.331, 7.35
c	0,2413	0.1412, 0.3414	0,2756	0.1379, 0.4133	0,3366	0.1556, 0.5176	0,2624	-0.7816, 1.306

Liite 12: Trifenyyliarseenioksidin (TPAO) siirtymien Matlab-sovituksista saadut siirtymät sekä pK_a -arvot (c.b.=confidence bounds):

	Hb	Hb c.b.	Hc	Hc c.b.	Hd	Hd c.b.
a	7,875	7.873, 7.877	7,804	7.802, 7.806	7,913	7.91, 7.915
b	7,723	7.722, 7.724	7,641	7.64, 7.641	7,711	7.711, 7.712
c	2,758	2.735, 2.781	2,762	2.739, 2.785	2,767	2.743, 2.791

Liite 13: Trifenyyliarseenioksidin (TPAO) J-kytkentöjen Matlab-sovituksista saadut J-kytkennät sekä pK_a -arvot (c.b.=confidence bounds):

	HcHc	HcHc c.b.	HcHd	HcHd c.b.	HcHb	HcHb c.b.	HbHc	HbHc c.b.	HdHb	HdHb c.b.	HbHb	HbHb c.b.
a	1,295	1.269, 1.321	7,61	7.596, 7.624	7,85	7.841, 7.86	0,5878	0.5769, 0.5987	1,188	1.179, 1.198	1,76	1.739, 1.782
b	1,305	1.295, 1.315	7,571	7.565, 7.576	7,727	7.723, 7.73	0,6089	0.6047, 0.6131	1,23	1.225, 1.235	1,651	1.643, 1.659
c	3,274	-5.958, 12.51	2,894	2.092, 3.695	2,854	2.696, 3.013	3,227	1.547, 4.907	3,889	2.876, 4.902	2,762	2.367, 3.157

Liite 14: Monofenyyliarsiinihapon (MPAA) siirtymien Matlab-sovituksista saadut siirtymät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds):

	Hb	Hb c.b.	Hc	Hc c.b.	Hd	Hd c.b.
a	7,856	7.854, 7.857	7,698	7.686, 7.711	7,775	7.761, 7.789
b	7,851	7.851, 7.852	7,669	7.664, 7.674	7,759	7.752, 7.767
c	7,84	7.839, 7.842	7,536	7.526, 7.546	7,587	7.574, 7.599
d	1,547	0.8404, 2.253	1,378	0.2957, 2.46	1,991	0.2137, 3.769
e	5,612	5.351, 5.873	5,56	5.377, 5.743	5,559	5.375, 5.744

Liite 15: Monofenyylarsiinihapon (MPAA) siirtymien reaktiotuotteen Matlab-sovituksista saadut siirtymät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds):

	Hb	Hb c.b.	Hc	Hc c.b.	Hd	Hd c.b.
a	7,908	7.907, 7.908	7,68	7.677, 7.682	7,718	7.274, 8.161
b	7,868	7.868, 7.868	7,646	7.645, 7.648	7,713	7.697, 7.729
c	7,877	7.863, 7.891	7,418	6.601, 8.234	7,694	7.68, 7.708
d	1,14	1.114, 1.166	1,61	1.44, 1.781	0,4144	-116.7, 117.5
e	6,234	5.181, 7.286	6,607	4.691, 8.524	4,769	2.937, 6.601

Liite 16: Monofenyylarsiinihapon (MPAA) reaktiotuotteen J-kytkentöjen Matlab-sovituksista saadut J-kytkennät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds). Tummanharmaalla merkityt arvot todettiin epäuskottaviksi tai muuten epäluotettaviksi:

	HcHc	HcHc c.b.	HcHd	HcHd c.b.	HcHb	HcHb c.b.	HbHc	HbHc c.b.	HdHb	HdHb c.b.	HbHb	HbHb c.b.
a	4,208	-2.14 e+8, 2.14 e+8	7,905	7.248, 8.562	6,884	3.845, 9.924	0,6632	0.3083, 1.018	0,2457	-0.07424, 0.5656	-0,002737	-0.6189, 0.6135
b	-0,7083	-2.3 e+7, 2.3 e+7	7,104	4.997, 9.211	7,948	7.646, 8.25	-43,32	-4.523 e+4, 4.514 e+4	-121	-1.386 e+5, 1.383 e+5	0,1395	-0.6647, 0.9436
c	0,02979	-0.1233, 0.1829	7,632	6.923, 8.342	7,687	7.042, 8.332	0,6053	0.168, 1.043	1,316	0.7628, 1.87	0,2848	-0.432, 1.002
d	0,2297	-4.062 e+7, 4.062 e+7	2,419	-0.4385, 5.276	0,7073	-4.336, 5.751	5,428	-451.1, 462	6,774	-491.8, 505.4	1,72	-9.171, 12.61
e	0,6216	-1.354 e+7, 1.354 e+7	4,402	-0.9434, 9.748	5,189	0.2982, 10.08	2,23	-447.6, 452	2,346	-493.2, 497.9	4,779	-7.659, 17.22

Liite 17: ”Pakotetut” monofenyylarsiinihapon (MPAA) reaktiotuotteen J-kytkentöjen Matlab-sovituksista saadut J-kytkennät sekä pK_{a1} - ja pK_{a2} -arvot (c.b.=confidence bounds):

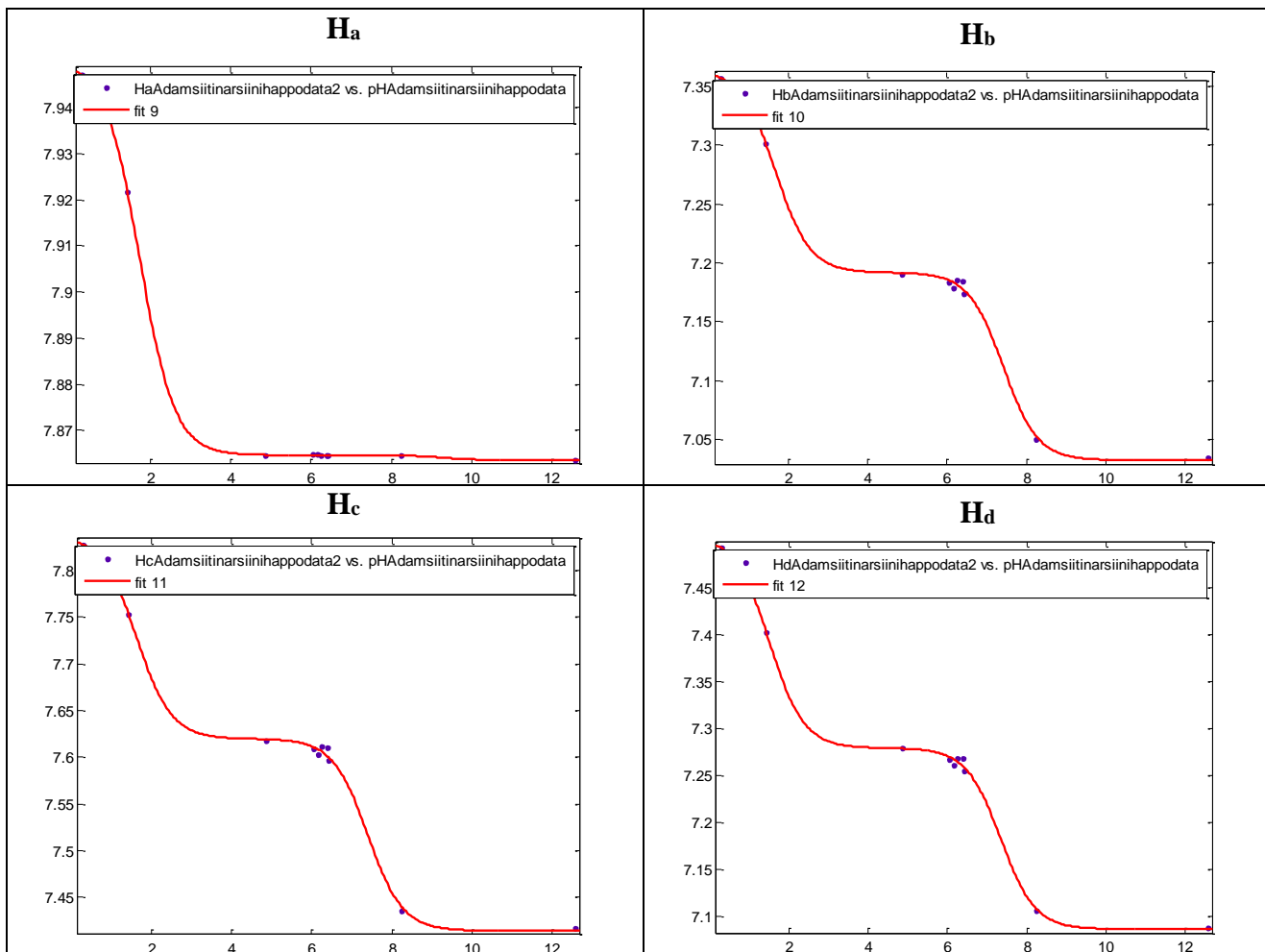
	HcHc	HcHc c.b.	HbHc	HbHc c.b.	HdHb	HdHb c.b.
a	3,924	3.468, 4.38	0,6778	0.2122, 1.143	0,2351	-0.3101, 0.7803
b	0,0214	-0.06639, 0.1092	5,35E-6	-1.344, 1.344	2,30E-8	-0.824, 0.824
c	0,005176	-22.6, 22.61	0,6627	0.1107, 1.215	1,433	0.6377, 2.227
d	2,22E-14	Annettuihin rajoihin pakotettu	3,014	-2.987, 9.015	3,101	-18.48, 24.68
e	6,418	-818.2, 831	4,595	1.784, 7.407	4,928	3.473, 6.382

Liite 18: Fenyylidiklooriarseenin (PDCA) siirtymien Matlab-sovituksista saadut siirtymät sekä pK_a -arvot (c.b.=confidence bounds):

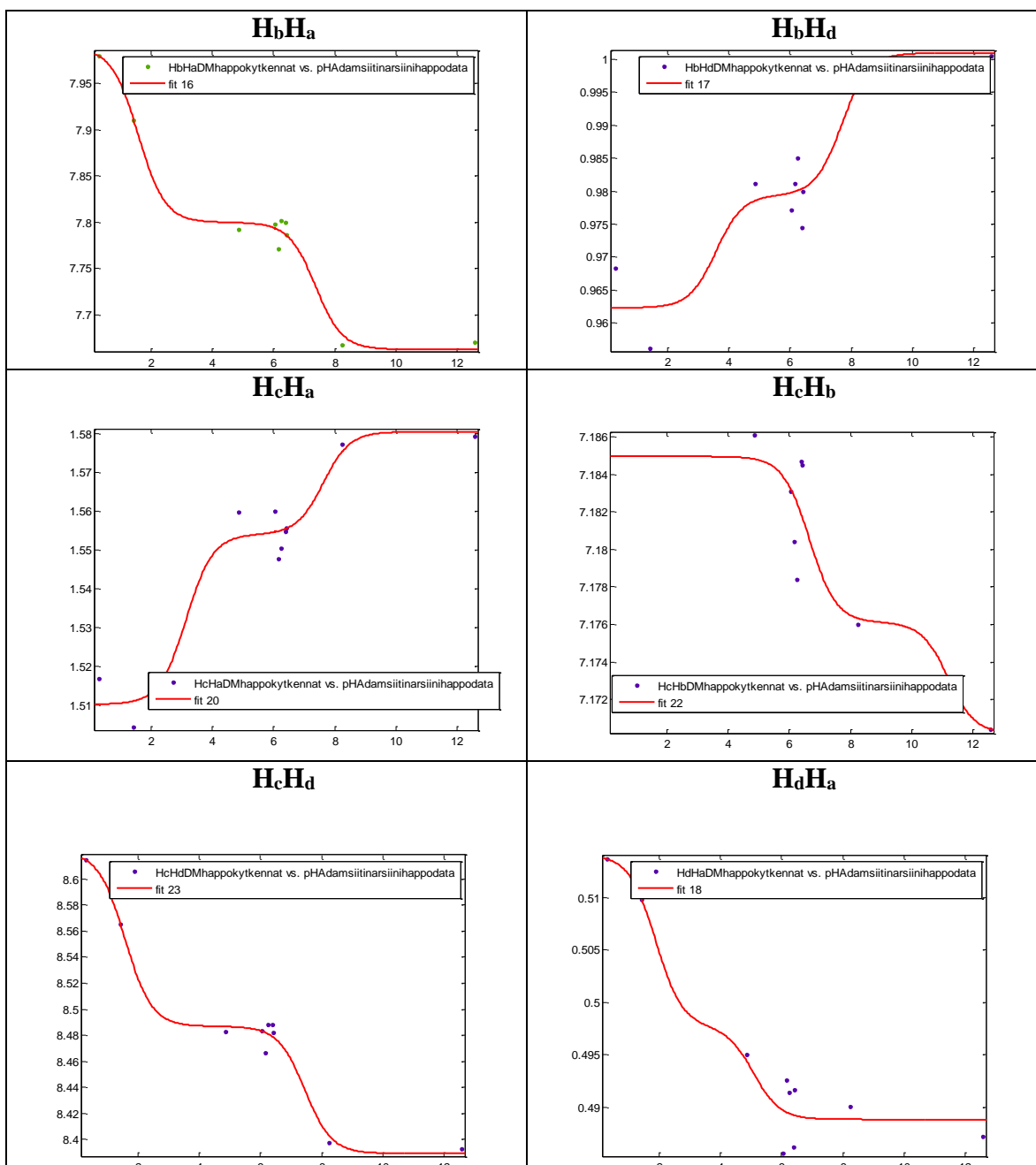
	Hb	Hb c.b.	Hc	Hc c.b.	Hd	Hd c.b.
a	7,745	7.713, 7.776	7,497	7.487, 7.506	7,492	7.481, 7.504
b	7,634	7.616, 7.651	7,469	7.464, 7.474	7,461	7.456, 7.467
c	1,331	0.9725, 1.69	1,274	0.8531, 1.694	1,266	0.8126, 1.719

Liitteet 19-23: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) ja sen reaktiotuotteen Matlab-sovitusten kuvaajat:

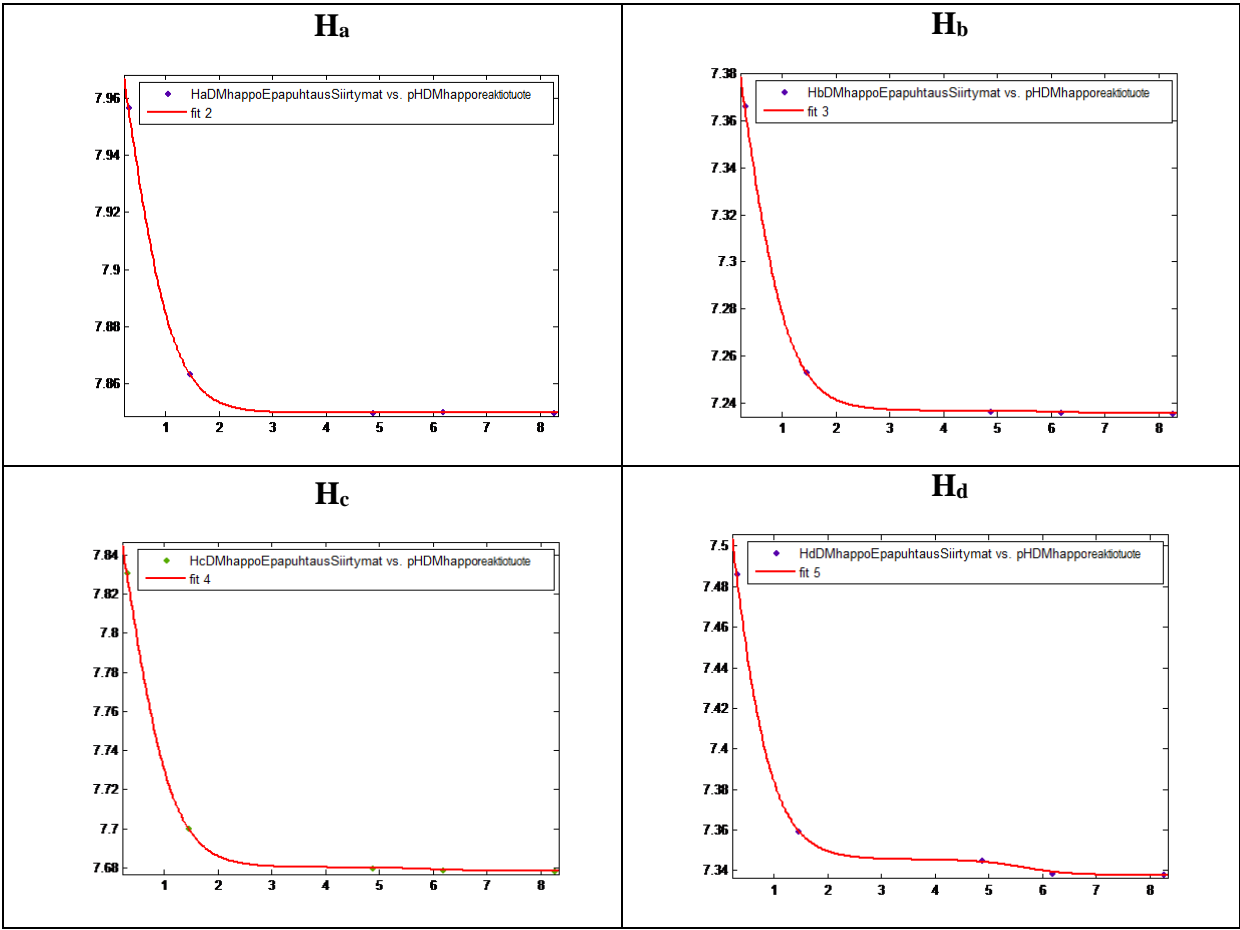
Liite 19: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) siirtymien diproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):



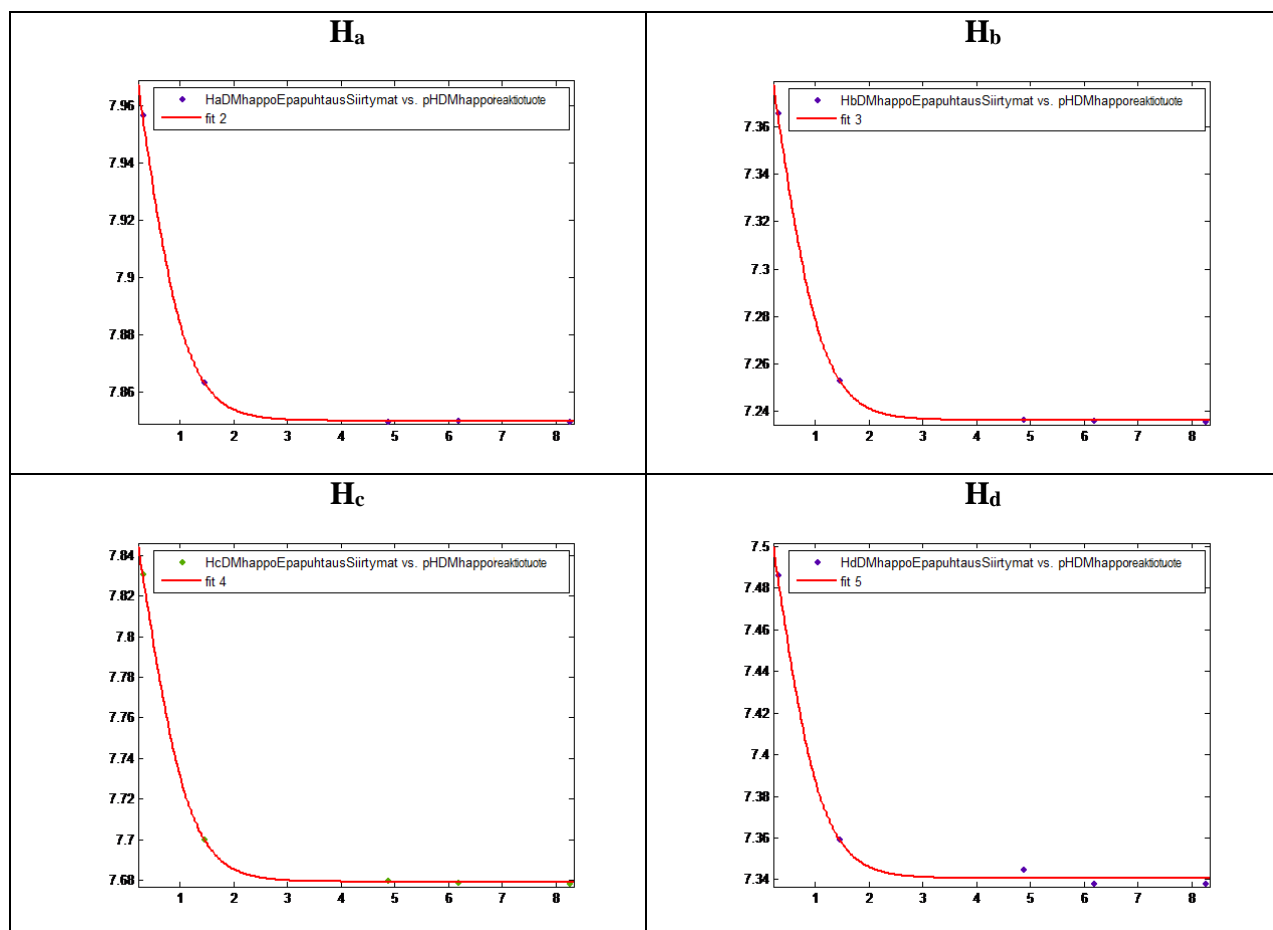
Liite 20: Adamsiitin arsiinihapon (DM-hapon) J-kytkentöjen diproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):



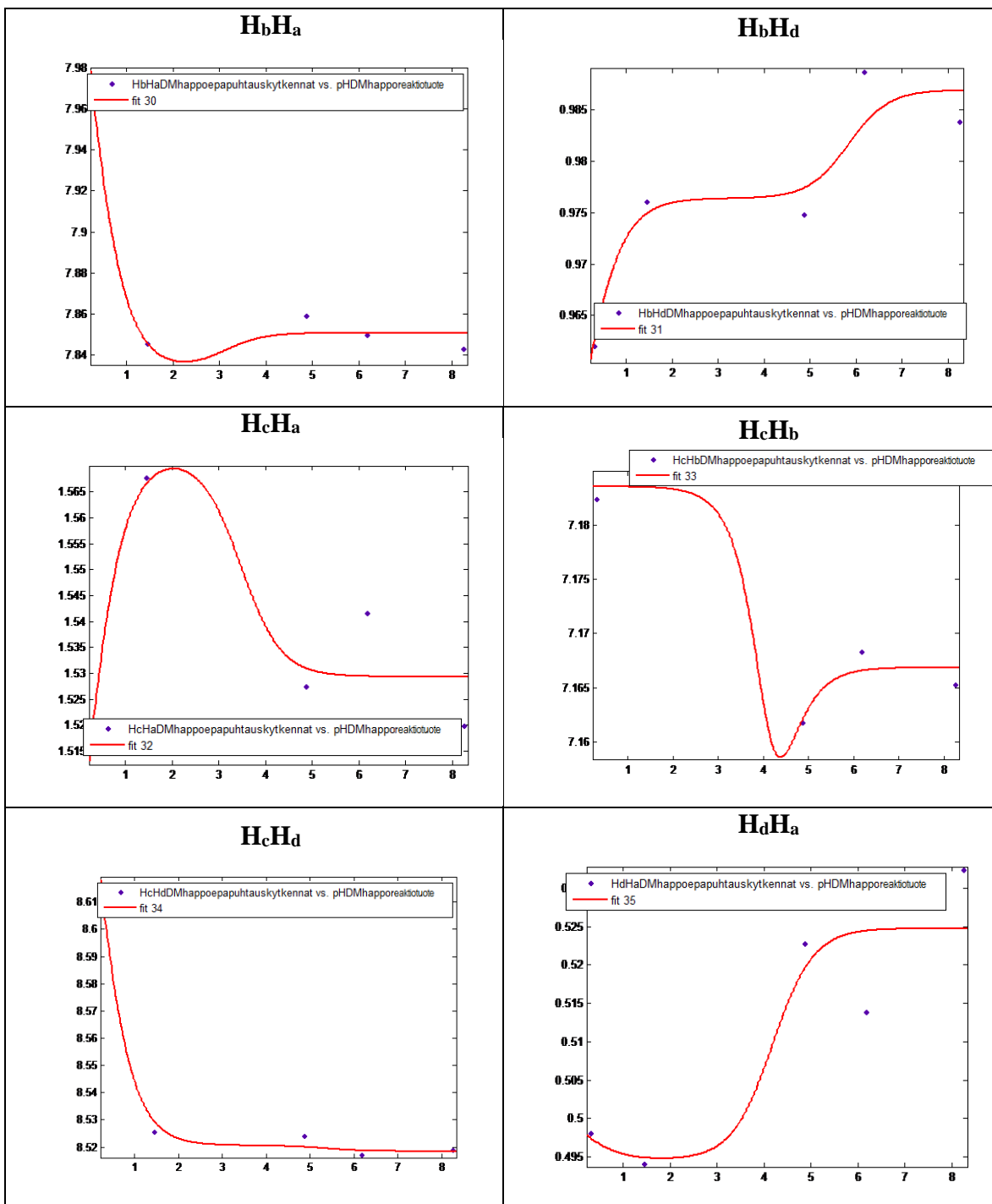
Liite 21: Adamsiitin arsiinihapon (DM-hapon) reaktiotuotteen siirtymien diproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):



Liite 22: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) reaktiotuotteen siirtymien monoproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):

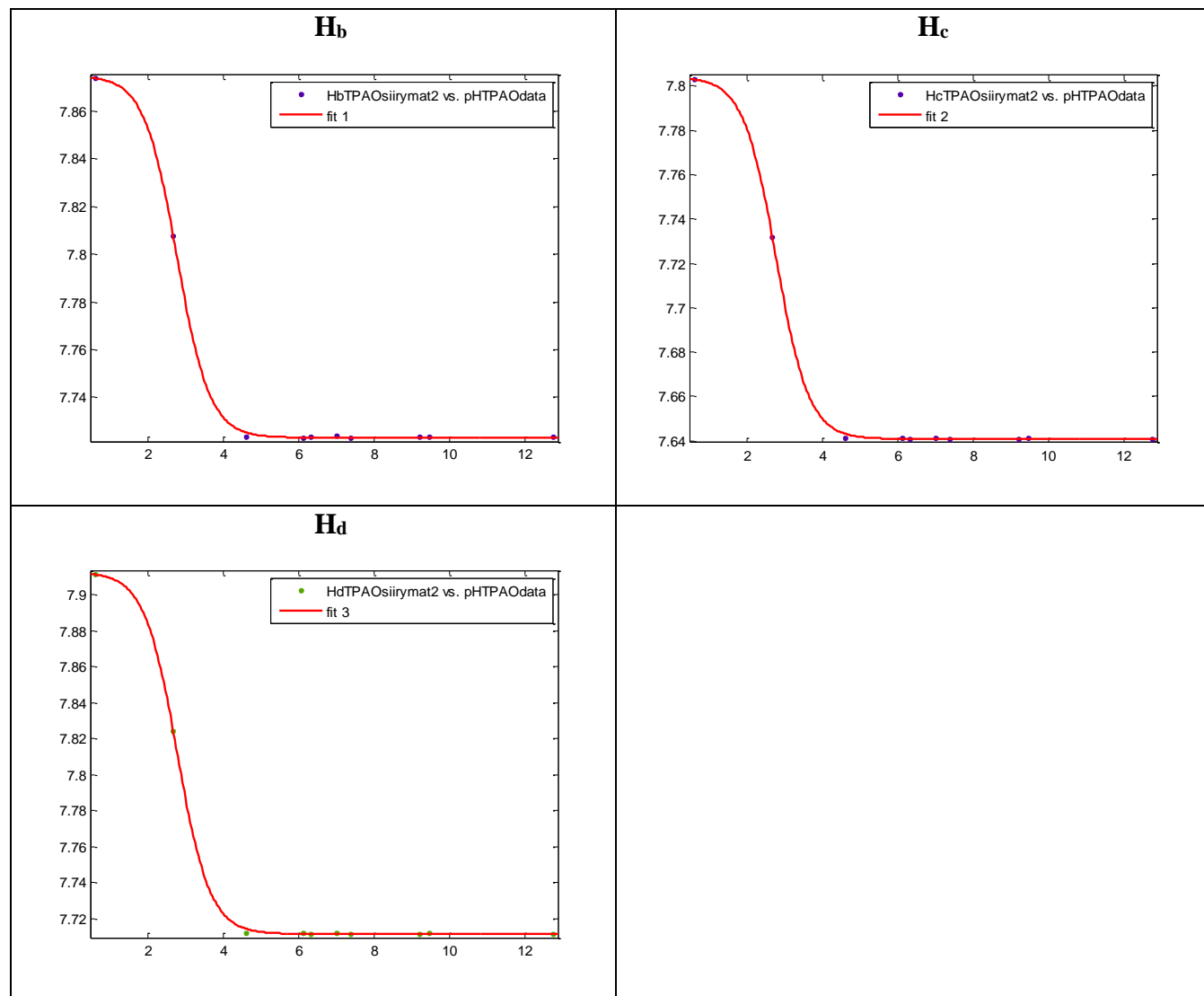


Liite 23: Adamsiitin arsiinihapon (DM-happo) reaktiotuotteen J-kytkentöjen diproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):

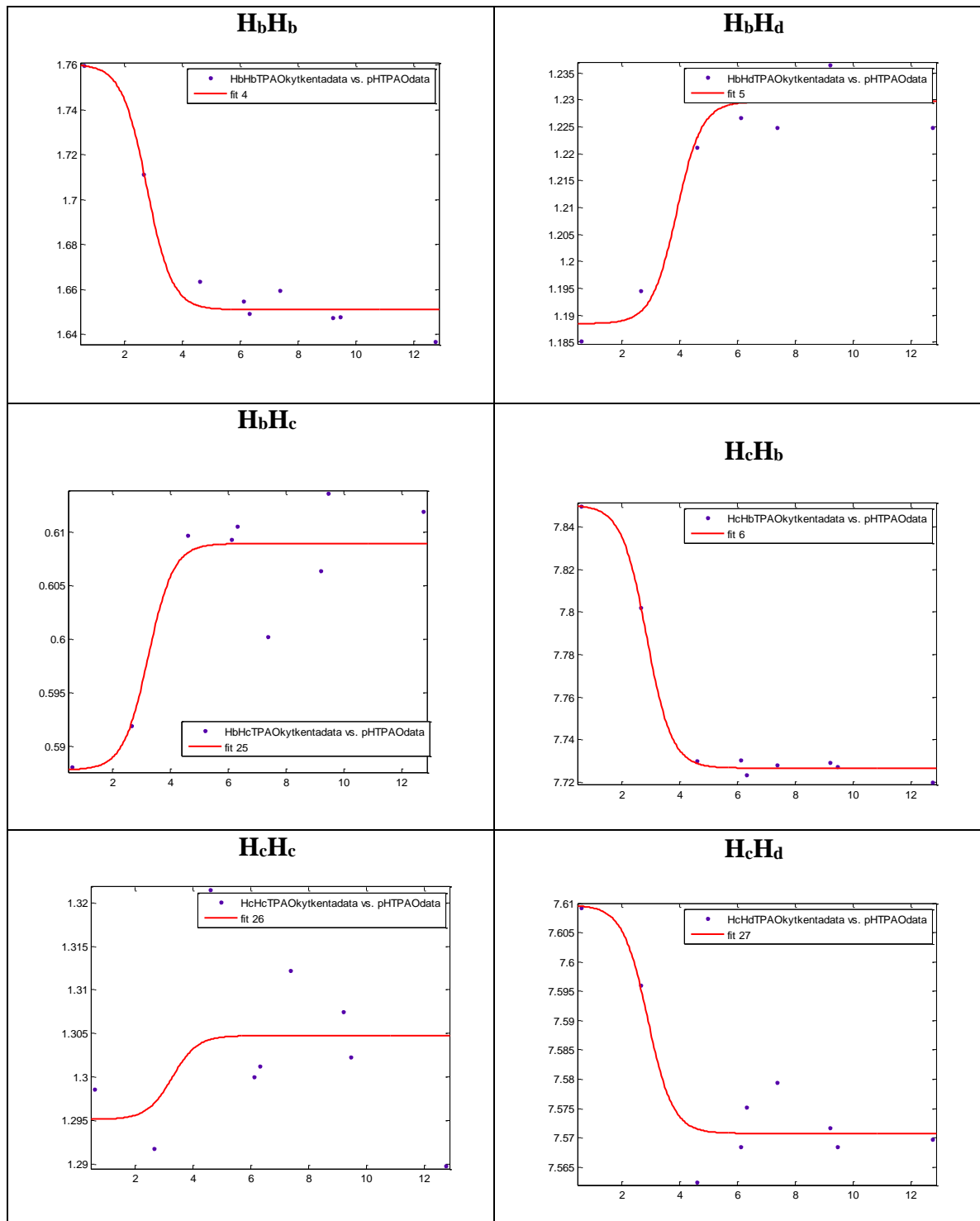


Liitteet 24 ja 25: Trifenyylarseenioksidin (TPAO) Matlab-sovitusten kuvaajat

Liite 24: Trifenyylarseenioksidin siirtymien monoproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):

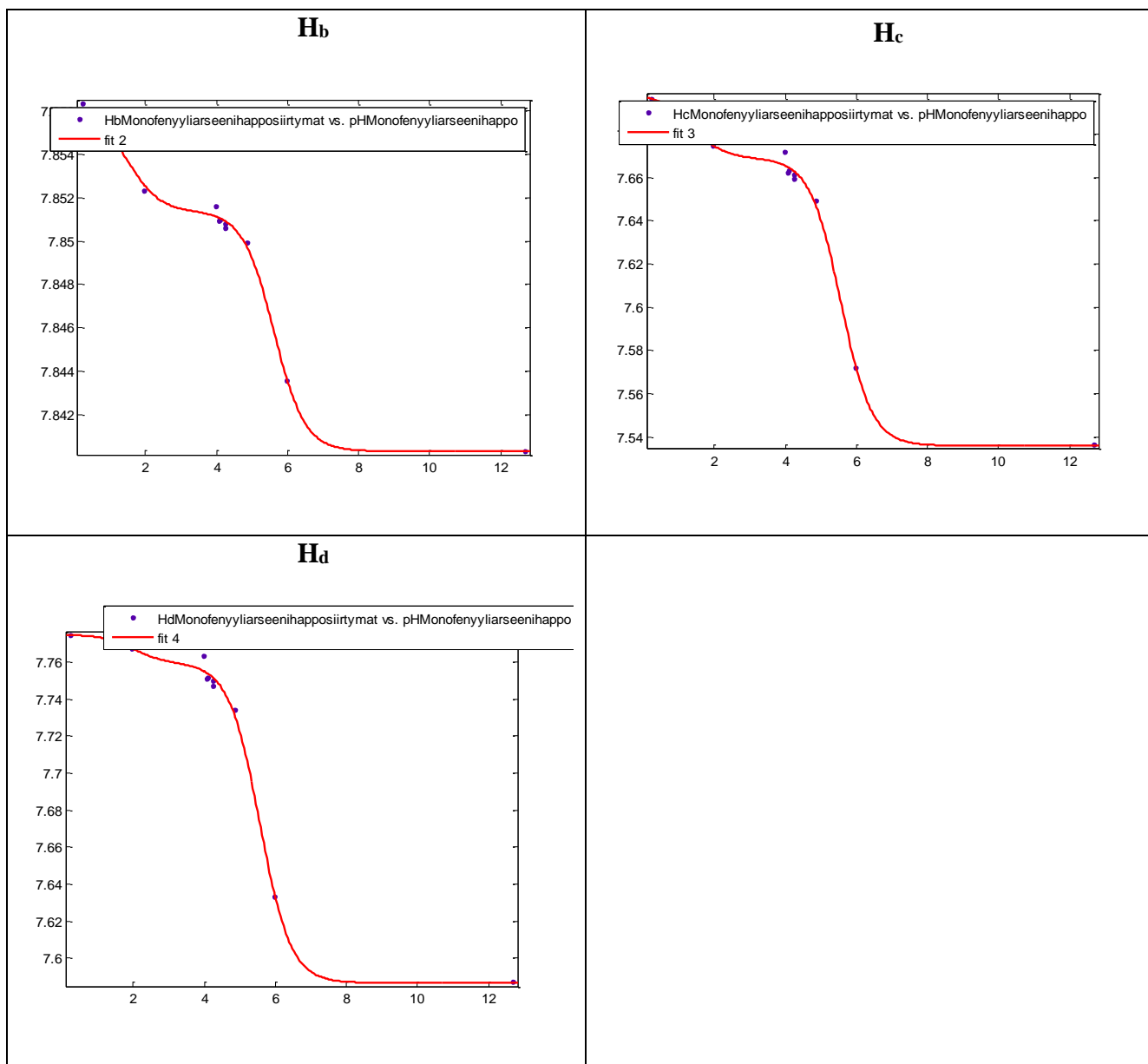


Liite 25: Trifenyyliarseenioksidin (TPAO) J-kytkentöjen monoproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):

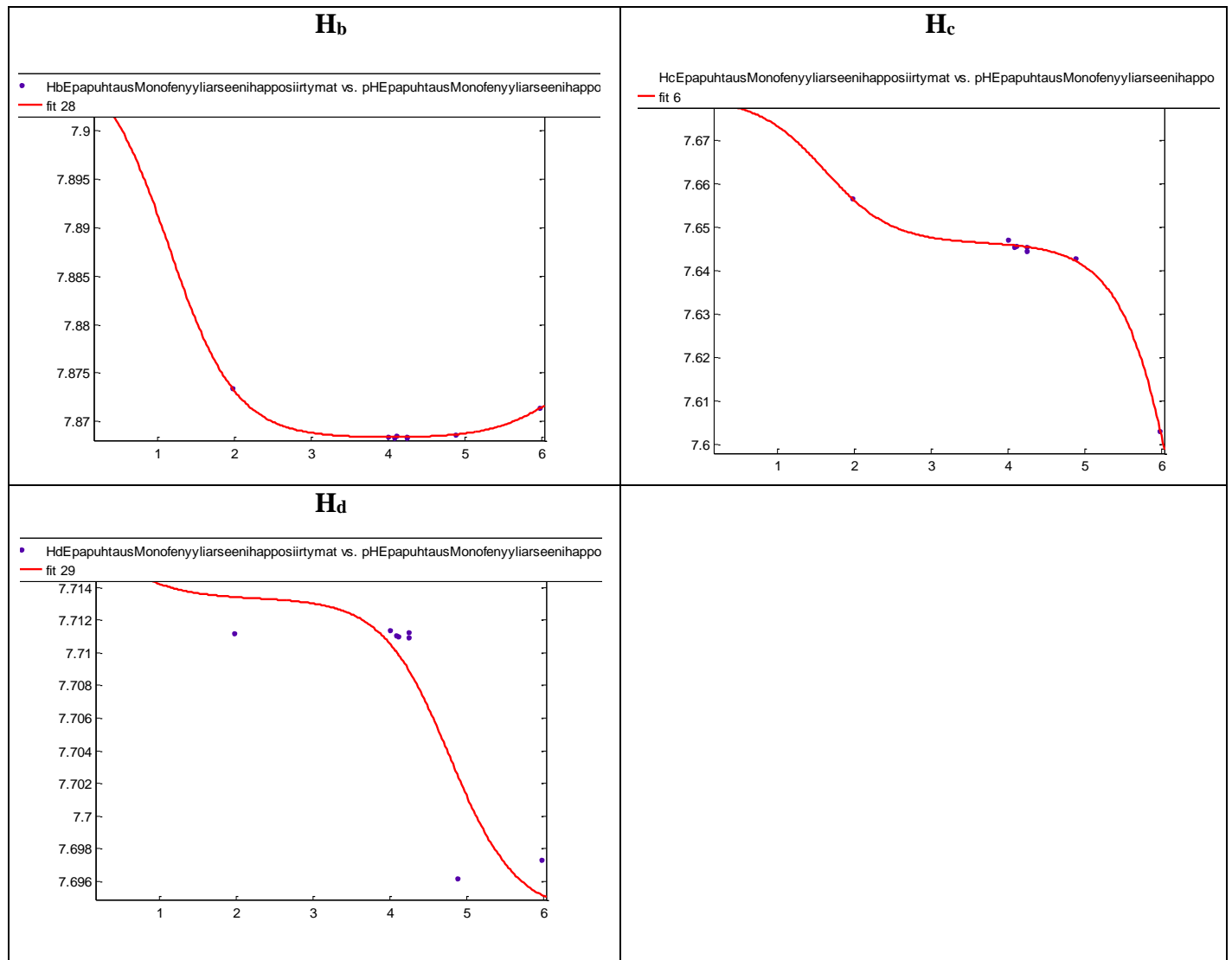


Liitteet 26-29: Monofenyyliaarsiinihapon (MPAA) ja sen reaktiotuotteen Matlab-sovitusten kuvaajat

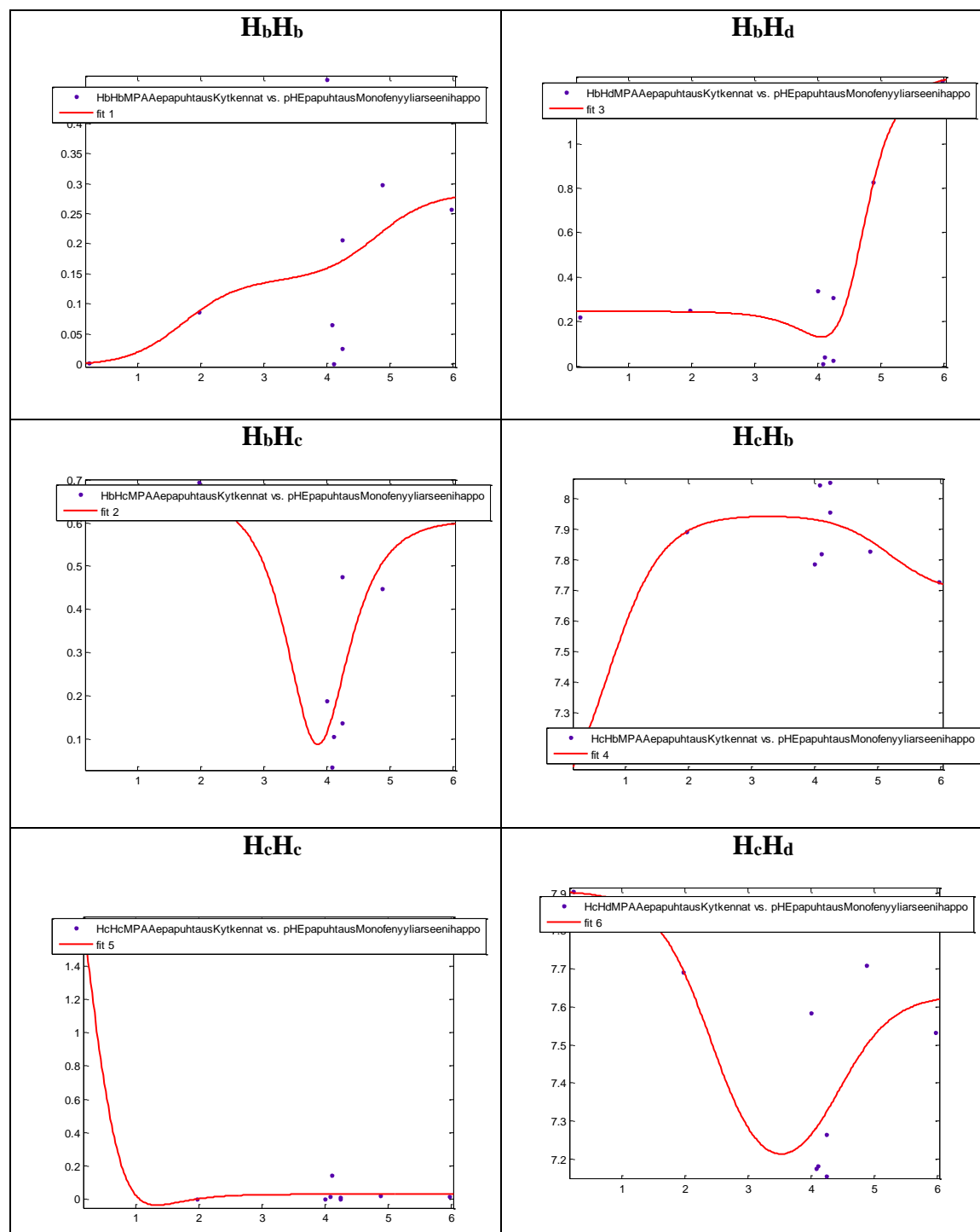
Liite 26: Monofenyyliaarsiinihapon (MPAA) siirtymien diproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):



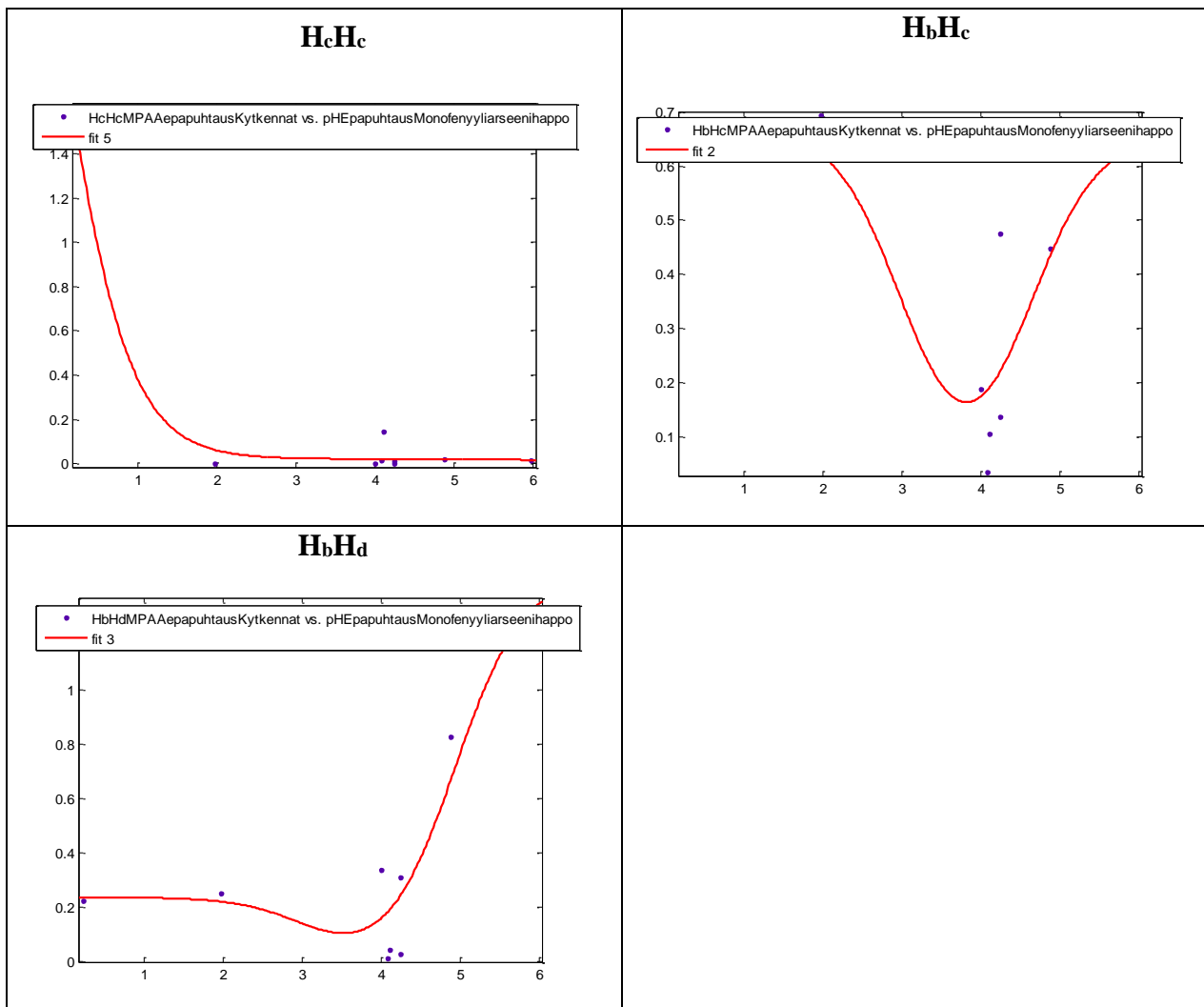
Liite 27: Monofenyyliaarsiinihapon (MPAA) reaktiotuotteen siirtymien diproottiset Matlab-sovitukset (siirtymä pH:n funktiona):



Liite 28: Monofenyylisäihapon (MPAA) reaktiotuotteen J-kytkentöjen diproottiset Matlab-sovitukset:

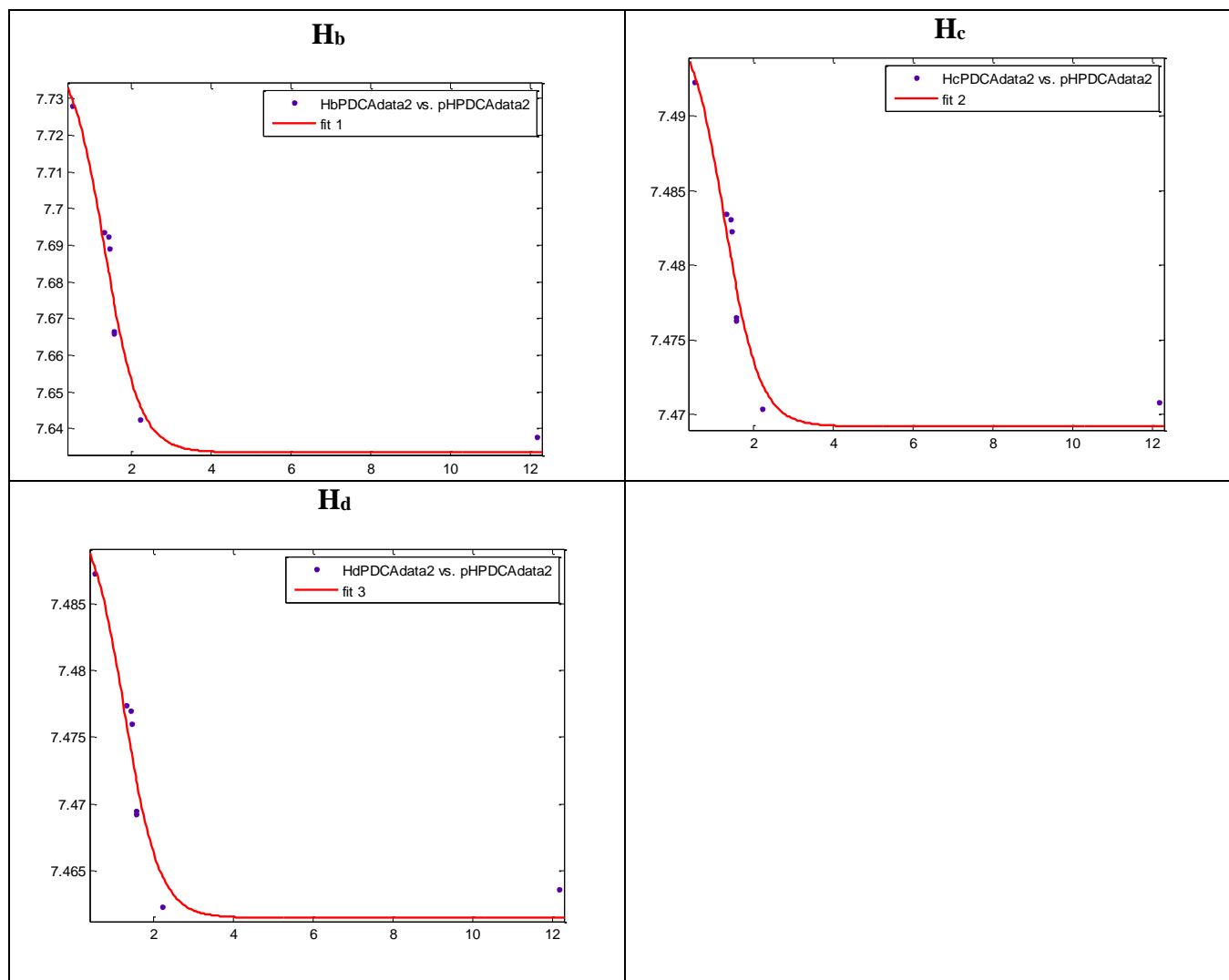


Liite 29: Monofenyyliarsiinihapon (MPAA) reaktiotuotteen J-kytkentöjen diproottisia sovituksia Matlabissa positiivisiksi pakotetuin sovitusarvoin:

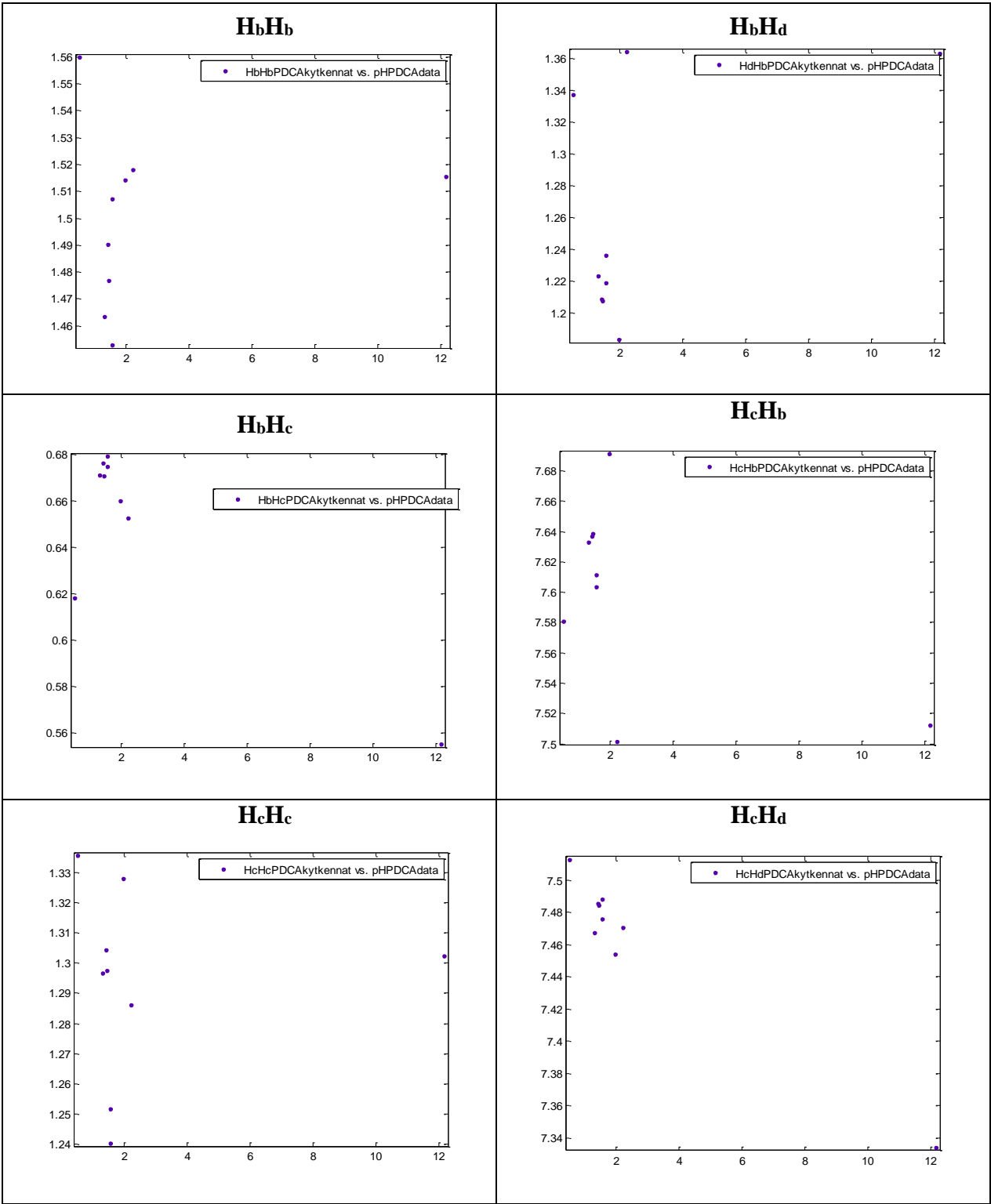


Liitteet 30 ja 31: Fenyylidiklooriarseenin (PDCA) Matlab-sovitusten kuvaajat

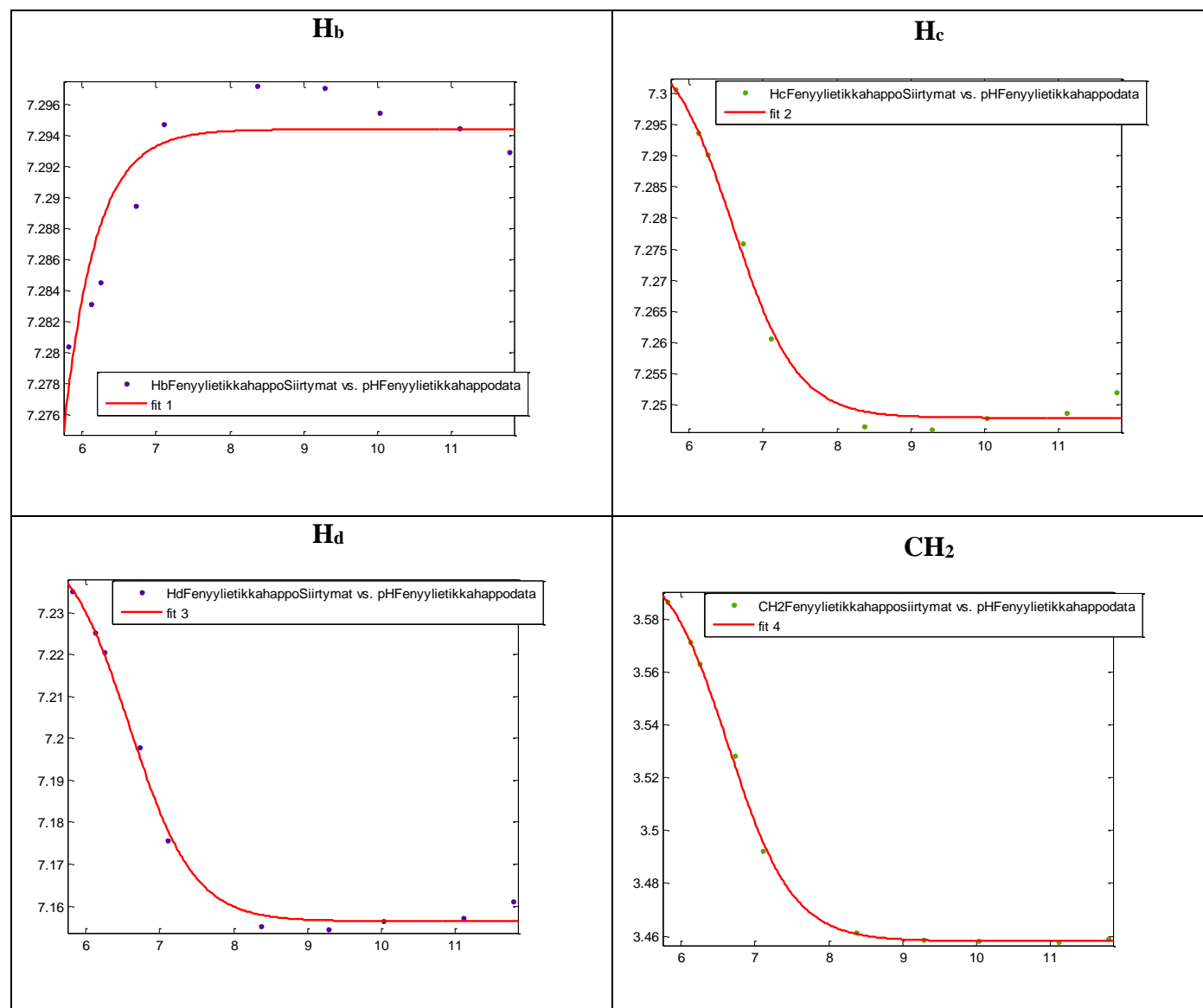
Liite 30: Fenyylidiklooriarseenin (PDCA) siirtymien monoproottiset Matlab-sovitukset



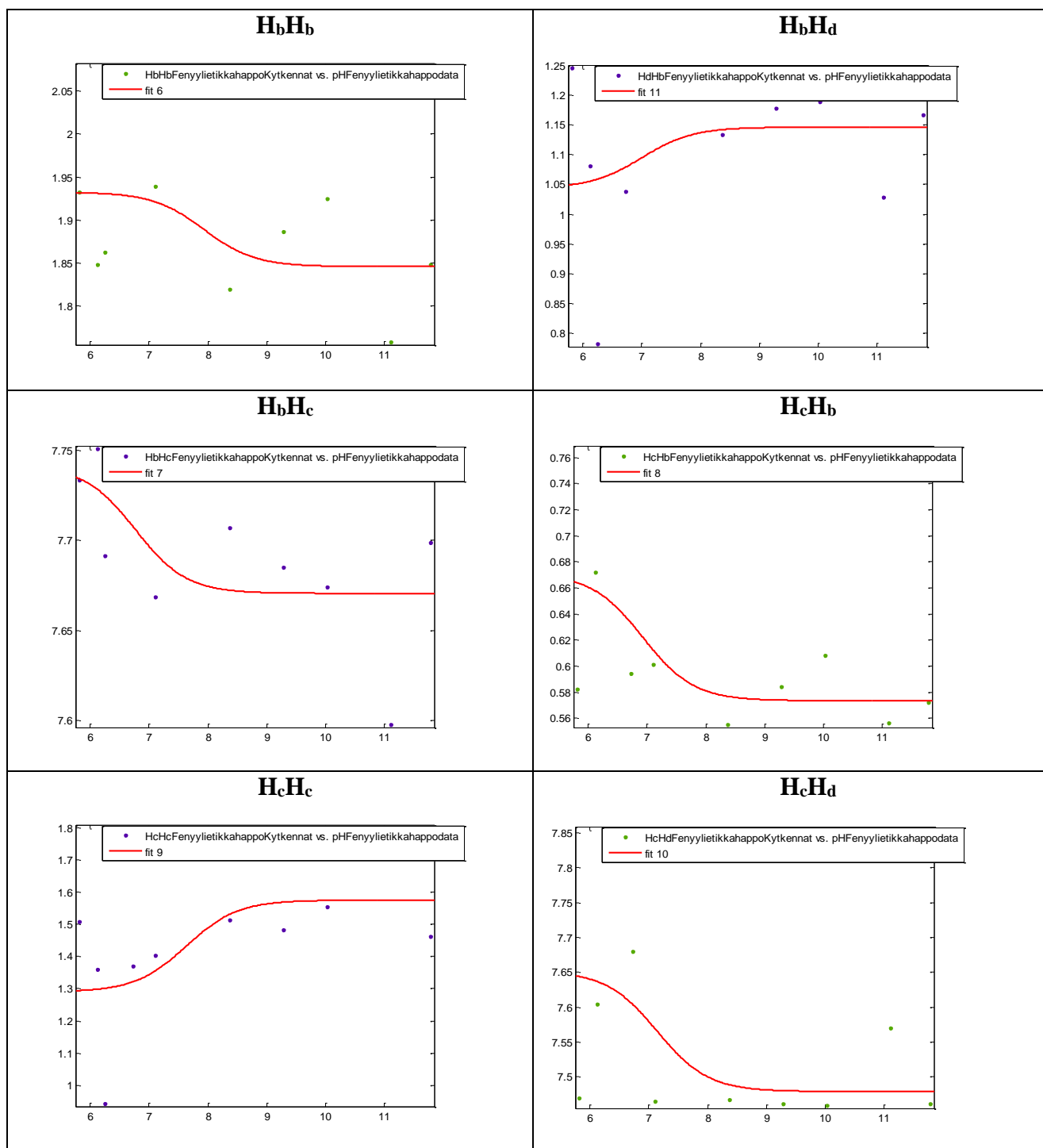
Liite 31: Fenyylidiklooriarseenin (PDCA) J-kytkennät pH:n funktiona



Liite 32: 2-Fenyylitikkahapon siirtymien monoproottiset sovitukset



Liite 33: 2-Fenyylietikahapon J-kytkennät pH:n funktiona ja niiden monoproottiset sovitukset lukuun ottamatta kytcentää H_bCH_2 (liite 34)



Liite 34: 2-Fenyylitietikahapon HbCH_2 -kytkentä pH:n funktiona ja sen monoproottinen sovitus

